

Aus dem Institut für Humangenetik der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktorin: Prof. Dr. med. Ortrud Steinlein

**Chromosomale und genetische Ursachen Juveniler
Schizophrenie: Prävalenzuntersuchung der Mikrodeletion
22q11.2 und der *CHRNA4*-776ins3-Mutation**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christine Monika Vogt, geb. Zwirner

aus München

2015

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatlerin:	Prof. Dr. med. Ortrud Steinlein
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Konstantin Strauch Priv. Doz. Dr. Peter Zill Prof. Dr. Peter Bartenstein
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. Rainer Wimmer, Dr. rer. nat. Christa Schmidt, PD Dr. rer. nat. Stefan Müller
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	26.03.2015

In tiefer Liebe für Luisa

„Vor langer Zeit - ... - waren die Götter von Yr Gefährten gewesen – heimliche Prinzen, die an ihrer Einsamkeit teilgehabt hatten. ... Aber irgend etwas veränderte sich, und Yr verwandelte sich von einer Quelle der Schönheit und des Schutzes zu einer Quelle von Furcht und Leid.“

(Hannah Green, Ich hab dir nie einen Rosengarten versprochen)

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1. Idee der Dissertation.....	1
1.2. Definition der (Juvenilen = Early-onset) Schizophrenie	1
1.3. Epidemiologie und enorme Bedeutung der (Juvenilen) Schizophrenie.....	2
1.4. Symptome, Diagnosestellung und Differenzialdiagnosen der Juvenilen Schizophrenie.....	3
1.5. Therapie der Juvenilen Schizophrenie.....	5
1.6. Prognose der Juvenilen Schizophrenie.....	6
1.7. Ätiopathogenese der Schizophrenie	7
1.7.1. Die Schizophrenie – ein multifaktorielles Krankheitsbild	7
1.7.2. Genetik	8
1.7.2.1. Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien	8
1.7.2.2. Methoden der genetischen Forschung.....	9
1.7.2.3. Molekulargenetik und genetische Architektur der Schizophrenie	11
1.7.2.4. Kandidatengene.....	12
1.7.3. Risikofaktor Mikrodeletion 22q11.2	14
1.7.3.1. 22q11.2-Deletionssyndrom (22q11.2DS)	15
1.7.3.2. Der psychiatrische Phänotyp beim 22q11.2DS.....	17
1.7.3.3. Kandidatengene für Schizophrenie im Deletionsbereich	19
1.7.3.4. Fragestellung zur Mikrodeletion 22q11.2	20
1.7.4. Risikofaktor ADNFLE-Mutation <i>CHRNA4-776ins3</i> ?	20
1.7.4.1. Das Krankheitsbild ADNFLE.....	20
1.7.4.2. Genetik der ADNFLE	21
1.7.4.3. Der neuronale nikotinische Azetylcholinrezeptor (nAChR).....	22
1.7.4.4. Die <i>CHRNA4-776ins3</i> -Mutation	23
1.7.4.5. Schizophrenie-ähnliche Auffälligkeiten der <i>CHRNA4-776ins3</i> -Mutationsträger ...	24
1.7.4.6. Fragestellung der Arbeit hinsichtlich der ADNFLE	25
1.8. Zusammenfassender Arbeitsauftrag der Dissertation.....	26
2. Zellmaterial	27
2.1. Vorbedingungen	27
2.2. Zellkulturen aus der Psychiatrischen Klinik der LMU.....	27
2.3. Blutproben aus den BZK Landshut, Passau, Regensburg und dem Heckscher-Klinikum München.....	29
2.4. DNA-Probe eines bekannten <i>CHRNA4-776ins3</i> -Mutationsträgers.....	30
2.5. DNA-Proben gesunder Medizinstudentinnen/-studenten	30
3. Methoden und methodenspezifisches Material	31
3.1. Chromosomenanalyse	31
3.1.1. Chromosomenpräparation.	31
3.1.1.1. ...aus Blutkultur.....	31
3.1.1.2. ...aus Lymphozytenkultur.....	33
3.1.2. Auftropfen der Zelllösung auf Objektträger.....	34
3.1.3. Verwendete Chromosomenfärbungen.....	35
3.1.3.1. GTG-Färbung.....	35

INHALTSVERZEICHNIS

3.1.3.2. Distamycin-DAPI-Färbung	37
3.1.4. Chromosomenauswertung	37
3.2. FISH	38
3.2.1. Hybridisierung in situ	38
3.2.2. Abbruch der Hybridisierung	40
3.2.3. Analyse	40
3.3. Genanalyse	41
3.3.1. DNA-Extraktion aus EDTA-Vollblut	41
3.3.2. Herstellen einheitlicher Konzentrationen der DNA-Proben	42
3.3.3. PCR	43
3.3.4. Gelelektrophorese auf 1%-igem Agarosegel	45
3.3.5. Restriktionsenzymverdau	47
3.3.6. Gelelektrophorese auf Polyacrylamidgel	48
3.3.7. Silberfärbung	50
4. Ergebnisse	52
4.1. Ergebnisübersicht	52
4.2. Chromosomenanalyse	58
4.2.1. Inversion inv(1)(p31q25)	58
4.2.2. Heterochromatinvarianten	59
4.2.2.1. ...des Chromosoms 9	59
4.2.2.2. ...des Y-Chromosoms	62
4.2.3. Marker und Auffälligkeit des Y-Chromosoms	62
4.2.4. Mosaik-Trisomie 12 - ein Kulturartefakt	64
4.2.5. Sequenzielle Chromosomenveränderungen	66
4.2.6. Komplexe chromosomale Aberration	68
4.2.7. Einzelne numerische und strukturelle Chromosomenauffälligkeiten	70
4.3. FISH	70
4.3.1. Verwendete Sonden	70
4.3.2. Beispiel einer Mikrodeletion 22q11.2	71
4.3.3. Tatsächliches Analyseergebnis	72
4.4. Genanalyse	74
4.4.1. Auswahl des geeigneten Restriktionsenzym	75
4.4.1.1. Entscheidung für die Restriktionsenzyme BclI und SduI	76
4.4.1.2. Restriktionsfragmente von BclI	77
4.4.1.3. Restriktionsfragmente von SduI	78
4.4.1.4. BclI als erste Wahl	79
4.4.2. PCR-(Mutagenese-)Primer	81
4.4.3. Überprüfen des PCR-Ergebnisses auf Agarosegel	82
4.4.3.1. Beispiel für eine nicht gelungene PCR	82
4.4.3.2. Beispiel für eine gelungene PCR	83
4.4.4. Ergebnis der <i>CHRNA4-776ins3</i> -Genanalyse, entstandene silbergefärbte Polyacrylamidgele	83
5. Diskussion	89
5.1. Kurze Zusammenfassung der Zielsetzung und der Ergebnisse der Dissertation	89
5.2. Diskussion des Zellmaterials – Schwächen	89
5.3. Chromosomenanalyse	90
5.3.1. Diskussion der Methode	90
5.3.2. Eigenes Ergebnis	91

INHALTSVERZEICHNIS

5.3.2.1. Perizentrische Inversion inv(1) (p31q25).....	91
5.3.2.2. Perizentrische Inversion der Heterochromatinregion von Chromosom 9	93
5.3.2.3. Marker-Chromosomen.....	94
5.3.2.4. Auffälligkeiten der Gonosomen.....	94
5.3.2.5. Kulturartefakte und einzelne numerische/strukturelle Chromosomen- aberrationen.....	95
5.3.2.6. Schlussfolgerung aus den eigenen Ergebnissen.....	96
5.4. Mikrodeletion 22q11.2.....	96
5.4.1. Diskussion der Methode.....	96
5.4.2. Eigenes Ergebnis.....	97
5.4.3. Vergleich des eigenen Ergebnisses mit der bestehenden Literatur	97
5.4.3.1. Studie von Ivanov et al., 2003.....	97
5.4.3.2. Studie von Usiskin et al., 1999.....	99
5.4.3.3. Studie von Sporn et al., 2004	99
5.4.3.4. Studie von Yan et al., 1998	99
5.4.3.5. Weitere Prävalenzstudien.....	100
5.4.3.6. Mikrodeletion 22q11 in CNV-Studien.....	100
5.4.3.7. Beurteilung des eigenen Ergebnisses im Kontext und Ideen für künftige Forschungsansätze	101
5.5. ADNFLE-Mutation <i>CHRNA4-776ins3</i>	103
5.5.1. Diskussion der Methode.....	103
5.5.2. Eigenes Ergebnis.....	105
5.5.3. Hinweise in der Literatur für einen ursächlichen Zusammenhang von Schizophrenie, Epilepsie (ADNFLE) und nikotinischem System	105
5.5.3.1. Epilepsie und Schizophrenie.....	105
5.5.3.2. ADNFLE, Schizophrenie und kognitive Auffälligkeiten.....	107
5.5.3.3. Schizophrenie und nikotinisches System	107
5.5.4. Ausblick	109
5.6. Genetik und Schizophrenie	109
5.6.1. Einordnung in den Gesamtzusammenhang: neuere Forschungsmethoden	109
5.6.2. Ausblick auf zukünftige Forschungen.....	111
6. Zusammenfassung	113
7. Anhang	115
8. Literaturverzeichnis.....	120
9. Danksagung	141
10. Erklärung.....	142

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A

A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ACh	Acetylcholin
AChR	Acetylcholinrezeptor
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit- und Hyperaktivitätssyndrom
ADNFLE	Autosomal-dominante nächtliche Frontallappenepilepsie
ANK3	Ankyrin 3 (<i>Gen</i>)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASTN1	Astrotactin (<i>Gen</i>)

B

BD	Bipolare Störung (disorder)
bHLH-Transkriptionsfaktor	basic Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor
Bp	Basenpaare
BZK	Bezirkskrankenhäuser
bzw.	beziehungsweise

C

C	Cytosin
CADASIL	Zerebrale autosomal-dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leucencephalopathie
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CATCH22	Cardiac anomalies, abnormal facies, thymic hypoplasia, cleft palate, hypocalcemia bei Mikrodeletion 22q11.2
ca.	circa
CDCV-/CDCA-Hypothese	Common disease – common variant bzw. allele-Hypothese
CDRV-/CDRA-Hypothese	Common disease – rare variant bzw. allele-Hypothese
CGH	Comparative Genome Hybridization
CHRNA2	Cholinergischer Rezeptor, nikotinisch, alpha Polypeptid 2 (neuronal) (<i>Gen</i>)
CHRNA4	Cholinergischer Rezeptor, nikotinisch, alpha 4 Untereinheit (<i>Gen</i>)
CHRNA4-776ins3	Insertion eines Basentriplets GCT/einer Aminosäure Leucin an Nucleotidposition 776 in Exon 5 des CHRNA4-Gens
CHRNA7	Cholinergischer Rezeptor, nikotinisch, alpha Polypeptid 7 (<i>Gen</i>)
CHRNA2	Cholinergischer Rezeptor, nikotinisch, beta Polypeptid 2 (neuronal) (<i>Gen</i>)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadrat-Zentimeter
CNV	Copy Number Variant
COMT	Catechol-o-Methyltransferase (<i>Gen</i>)
COS	Childhood-onset Schizophrenie
CRH	Corticotropin-releasing Hormon
°C	Grad Celsius

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

D

D	Deutschland
DD	Differenzialdiagnose
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEAC	Diethylaminocoumarin
del	chromosomale Deletion
Del.22q11.2	Mikrodeletion 22q11.2
dest.	destilliert
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
<i>DISC1</i>	Disrupted in schizophrenia 1 (<i>Gen</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (acid)
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DSM-III/DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Auflage III bzw. IV; -R: Revision, -TR: Text Revision
DZ	Dizygote = Zweieiige Zwillinge
d.h.	das heißt

E

EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure (acid)
EEG	Elektroenzephalografie
EOS	Early-onset Schizophrenie
et al.	et alii = und andere
ExE-Interaktionen	Umwelt-Umwelt (environment)-Interaktionen

F

FGA	First-generation Antipsychotic
FISH	Fluoreszenz in situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FLE	Frontallappenepilepsie
FPEVF	Familial Partial Epilepsy with Variable Foci
FRET	Fluorescence resonance energy transfer

G

g	Gramm
G	Guanin
GCT	Basentriplett Guanin-Cytosin-Thymin
ggf.	gegebenenfalls
<i>GLUL</i>	Glutaminsynthetase (<i>Gen</i>)
GTG-Färbung	G-bands by trypsin using Giemsa
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie(n)
GxE-Interaktionen	Gen-Umwelt (environment)-Interaktionen

I

ICD-10	International Classification of Diseases, Ausgabe 10
IE	Internationale Einheiten
ins	Insertion
iPSCs	induzierte pluripotente Stammzellen

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

IQ	Intelligenzquotient
ISC	International Schizophrenia Consortium
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
K	
Kb	Kilobasen
L	
l	Liter
LCR	Low Copy Repeat
LGIC	Ligand-gated Ion Channel
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
LOD-Score	Logarithm of the odds
M	
M	Molar
mA	Milliampere
max.	maximal
Mb	Megabasen
mg	Milligramm
Min.	Minute(n)
mRNA	messenger (Boten)-RNA
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification assay
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MZ	Monozygote = Eineiige Zwillinge
M.	Morbus
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
N	
N	Maßeinheit, 1 N = 1 mol/l
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
ng	Nanogramm
NIMH	National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
<i>NOTCH4</i>	Neurogenic locus notch homolog protein 4-Gen
P	
p	p-Arm = kurzer Arm eines Chromosoms
PAA	Polyacrylamid
PANSS	Positive and Negative Syndrome Scale
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PD	Privatdozent

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>PDE4B</i>	Phosphodiesterase 4B, cAMP-spezifisch (<i>Gen</i>)
pmol	Picomol
Q	
q	q-Arm = langer Arm eines Chromosoms
R	
<i>RELN</i>	Reelin (<i>Gen</i>)
REM-Schlaf	Rapid Eye Movement-Schlaf
RNA	Ribonukleinsäure (acid)
rpm	Umdrehungen (rounds) pro Minute
RPMI	Zellkulturmedium, welches am Roswell Park Memorial Institute entwickelt wurde
S	
SCAN	Schedules for Clinical Assessment in Neuropsychiatry
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SE-Puffer	Saline-EDTA-Puffer
Sek.	Sekunde(n)
Ser248Phe	Austausch der Aminosäure Serin gegen Phenylalanin bei Position 248 des <i>CHRNA4</i> -Gens
SGA	Second-generation Antipsychotic
SKID-I/SKID-II	Strukturiertes klinisches Interview zur Diagnose psychischer Störungen der Achse I bzw. II von DSM-IV
SLPE	Schizophrenia-Like Psychosis of Epilepsy
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SRY	Sex-determining region des Y-Chromosoms
SSC	Saline Sodium Citrat
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis
Std.	Stunde(n)
SZ	Schizophrenie
T	
t	Translokation
T	Thymin
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> , thermophiles Bakterium
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
<i>TCF4</i>	Transkriptionsfaktor 4 (<i>Gen</i>)
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
TLE	Temporallappenepilepsie
TM	Transmembrandomäne
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyant
U	
U	Umdrehungen

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

u.a.	unter anderem/und andere
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	
V	Volt oder Version
v.a.	vor allem
Val158Met	Austausch der Aminosäure Valin gegen Methionin bei Codon 158 des <i>COMT</i> -Gens, Polymorphismus
VCFS	Velo-Cardio-Faziales Syndrom
VEOS	Very-early-onset Schizophrenie
W	
WPW-Syndrom	Wolff-Parkinson-White-Syndrom
Z	
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem
22q11.2DS	22q11.2-Deletionssyndrom

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Schizophrene Erkrankungen nach ICD-10 und DSM-IV-TR (aus Möller et al., 2009)	4
Tabelle 2	Klassifikation der Subtypen schizophrener Erkrankungen (aus Möller et al., 2009)	5
Tabelle 3	Differenzialdiagnosen der EOS (aus Remschmidt/Theisen, 2012)	5
Tabelle 4	Prädiktoren für einen chronischen, ungünstigen Verlauf der Schizophrenie allgemein	6
Tabelle 5	Zusammenfassung wichtiger Suszeptibilitätsgene für Schizophrenie	12
Tabelle 6	Ergebnisübersicht	52
Tabelle 7	Einzelne numerische und strukturelle Chromosomenauffälligkeiten	70
Tabelle 8	Restriktionsenzym suche	76

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Steigende Zahl der Neuveröffentlichungen zum Thema Schizophrenie und Genetik von 2000 – 2011 (Idee siehe http://www.schizophreniaforum.org/whatweknow/default.asp)	3
Abb. 2 Verteilung der unterschiedlichen Deletionsgrößen beim 22q11.2DS (aus Ivanov et al., 2003)	15
Abb. 3 Typische Fazies einer jungen Patientin mit 22q11.2DS (aus Shprintzen, 2000)	16
Abb. 4 Häufige neuropsychiatrische Symptome bei 22q11DS (aus Sieberer et al., 2006)	17
Abb. 5 Struktur des neuronalen nAChR in geöffnetem Zustand (aus di Corcia et al., 2005)	23
Abb. 6 Stammbaum der norwegischen ADNFL-E-Familie mit der CHRNA4-776ins3-Mutation (aus Steinlein et al., 1997)	24
Abb. 7 Karyogramm des Patienten SGN 5473 PP: 46,XY,inv(1)(p31q25)	58
Abb. 8 auffällige Patientenprobe SGN 5057 PP	59
Abb. 9 auffällige Patientenprobe SGN 3039	60
Abb. 10 Distamycin-DAPI-Färbung von SGN 5057 PP: inv(9) (p11q13)	61
Abb. 11 Distamycin-DAPI-Färbung von SGN 3039: inv(9) (p11q13)	61
Abb. 12 Chromosomale DAPI-Gegenfärbung nach FISH, Probe A17: Yqh+	62
Abb. 13 Karyogramm des Patienten SGN 5275 PP: 46,XY,+mar	63
Abb. 14 Karyogramm des Patienten SGN 5275 PP, hier mit auffälligem Y-Chromosom	64
Abb. 15 Karyogramm des Patienten SGN 5402 PP: 46,XY	65
Abb. 16 Karyogramm des Patienten SGN 5402 PP: 47,XY,+12 (ein Drittel der Mitosen)	65
Abb. 17 Karyogramm des Patienten SGN 5159 PP: 46,XY,der(2)add(2p)	66
Abb. 18 Karyogramm des Patienten SGN 5159 PP: 46,XY,der(2)add(2p),t(3;20)	67
Abb. 19 Karyogramm des Patienten SGN 5159 PP: 46,X,der(2)add(2p),t(3;20),+20	67
Abb. 20 Karyogramm des Patienten SGN 5201 PP: komplexe Chromosomenaberration, Bild 1	68
Abb. 21 Karyogramm des Patienten SGN 5201 PP: komplexe Chromosomenaberration, Bild 2	69
Abb. 22 Karyogramm des Patienten SGN 5201 PP, zweite Charge: unauffälliger Karyotyp 46,XX	69
Abb. 23 Vysis DiGeorge Region Probe (http://www.abbottmolecular.com/us/chromosome/22.html)	71
Abb. 24 Nachweis einer Mikrodeletion 22q11.2 mittels FISH (Beispiel)	72
Abb. 25 Metaphase-FISH der Probe SGN 3256	73
Abb. 26 Metaphase-FISH der Probe SGN 3255	73
Abb. 27 Interphase-FISH der Probe SGN 3051	74
Abb. 28 „normale“ Basensequenz von Exon 5 des CHRNA4-Gens	75
Abb. 29 Exon 5-Basensequenz im Falle der 776ins3-Mutation	75
Abb. 30 Enzym BclI: DNA-Spaltstücke ohne CHRNA4-776ins3-Mutation	78
Abb. 31 Enzym BclI: DNA-„Spaltstück“ mit CHRNA4-776ins3-Mutation	78
Abb. 32 Enzym SduI: DNA-Spaltstücke ohne CHRNA4-776ins3-Mutation	79
Abb. 33 Enzym SduI: DNA-Spaltstücke mit CHRNA4-776ins3-Mutation	79
Abb. 34 Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der Test-Genanalyse	80
Abb. 35 Enzym BclI mit einer zusätzlich geschaffenen Kontroll-Schneidestelle: DNA-Spaltstücke ohne CHRNA4-776ins3-Mutation	81
Abb. 36 Enzym BclI mit einer zusätzlich geschaffenen Kontroll-Schneidestelle: DNA-Spaltstücke mit CHRNA4-776ins3-Mutation	81
Abb. 37 Beispiel für eine nicht-gelungene PCR, Agarosegel	82
Abb. 38 Beispiel für eine gelungene PCR, Agarosegel	83

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 39 Silbergefärbtes Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der Genanalyse, Bild 1	84
Abb. 40 Silbergefärbtes Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der Genanalyse, Bild 2	84
Abb. 41 Silbergefärbtes Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der Genanalyse, Bild 3	85
Abb. 42 Silbergefärbtes Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der Genanalyse, Bild 4	85
Abb. 43 Silbergefärbtes Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der Genanalyse, Bild 5	86
Abb. 44 Silbergefärbtes Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der Genanalyse, Bild 6	86
Abb. 45 Silbergefärbtes Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der Genanalyse, Bild 7	87
Abb. 46 Silbergefärbtes Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der Genanalyse, Bild 8	87
Abb. 47 Silbergefärbtes Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der Genanalyse, Bild 9	88
Abb. 48 Silbergefärbtes Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der Genanalyse, Bild 10	88
Abb. 49 Suszeptibilitätsgene für Schizophrenie auf Chromosom 1 (http://www.szgene.org/chromo.asp?c=1)	92
Abb. 50 Altersverteilung der juvenilen Psychosepatienten bei Ivanov et al., 2003	98
Abb. 51 Prävalenz der 22q11.2-Deletion bei Schizophrenie (SZ)-Patienten (aus Bassett/Chow, 2008)	116
Abb. 52 Die bekannten ADNFLE-Familien mit klinischen, insbesondere neurologisch- psychiatrischen Merkmalen (aus Steinlein et al., 2012)	117
Abb. 53 Erhebungsbogen für die BZK Landshut, Passau, Regensburg und dem Heckscher- Klinikum München	119

1. Einleitung

1. Einleitung

1.1. Idee der Dissertation

Man geht davon aus, dass Patienten, die bereits in jungen Jahren an Schizophrenie erkranken, mehr zyto- und molekulargenetische Auffälligkeiten besitzen, als dies bei erwachsenen Schizophreniepatienten der Fall ist. Diese jungen Patienten waren den potenziell für die Schizophrenie relevanten Umweltfaktoren und Lebensereignissen weniger ausgesetzt (Kumra/Schulz, 2008) und bieten eine hervorragende Möglichkeit für die Erforschung genetischer Komponenten dieser Erkrankung. Auch in anderen Bereichen der Medizin ist es bereits gelungen, Einblick in die Ätiopathogenese von Erkrankungen über die Erforschung besonders jung erkrankter Patienten zu bekommen (Nicolson/Rapoport, 1999). Beispiele hierfür sind der Insulin-abhängige Diabetes mellitus (Weiss, 1993), das Mammakarzinom (FitzGerald et al., 1996), die Alzheimer-Erkrankung (St. George-Hyslop et al., 1996) und der M. Parkinson (www.parkinson-web.de).

Kandidatengen- oder Assoziationsstudien sind ein Ansatz, um nach molekulargenetischen „Schlüssel“-Signalwegen im Verständnis der Ätiopathogenese der Schizophrenie zu suchen. Das Augenmerk der Dissertationsarbeit liegt dabei auf der Mikrodeletion 22q11.2 und auf der ADNFLE-Mutation *CHRNA4-776ins3*.

Die Mikrodeletion 22q11.2 ist eine der wenigen chromosomalen Aberrationen – wenn nicht gar die einzige chromosomale Aberration –, die durch ihre große Replizierbarkeit als gesicherter Risikofaktor für die Entwicklung einer Schizophrenie gilt. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob diese Mutation auch mit der Juvenilen Schizophrenie assoziiert ist.

Die ADNFLE-Mutation *CHRNA4-776ins3* kosegregiert mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis in einer großen norwegischen Familie mit familiärer nächtlicher Frontallappenepilepsie. *CHRNA4* selber, wie auch andere Untereinheiten des nikotinischen Azetylcholinrezeptors, kann als funktionelles Kandidatengen betrachtet werden (Zipp, 2005). So gibt es Hinweise für eine Beteiligung nikotinischer Systeme an der Krankheitsentstehung der Schizophrenie (siehe Diskussionsteil, Kapitel 5.5.3.3.).

1.2. Definition der (Juvenilen = Early-onset) Schizophrenie

„Die schizophrenen Psychosen gehören zur Hauptgruppe der endogenen Psychosen. [...] Bei diesen Erkrankungen kommt es zum Auftreten charakteristischer, symptomatisch oft sehr vielgestaltiger psychopathologischer Querschnittsbilder mit Wahn, Halluzinationen, formalen Denkstörungen, Ich-Störungen, Affektstörungen und psychomotorischen Störungen. Nachweisbare körperliche Ursachen, aus denen im Einzelfall die Diagnose gestellt werden könnte, fehlen.“ (Möller et al., 2009)

Laut Möller handelt es sich bei der Schizophrenie „um die prognostisch schwerwiegendste psychische Erkrankung, wenn man von den organischen Erkrankungen absieht“ (Möller et al., 2009).

Für die Schizophrenien mit besonders frühem Erkrankungsbeginn gibt es folgende, zum Teil etwas unterschiedliche Definitionen:

- * Very-early-onset Schizophrenie (VEOS): Erkrankungsalter < 13 Jahre (Remschmidt/Theisen, 2012; Werry et al., 1991)

1. Einleitung

- * **Early-onset Schizophrenie (EOS): Erkrankungsalter < 18 Jahre (die VEOS ist somit eine Unterform der EOS) (Remschmidt/Theisen, 2012; Werry et al., 1991) oder Juvenile Schizophrenie: 7 – 17 Jahre (Hollis, 1995)**
- * Childhood-onset Schizophrenie (COS) oder „präpubertale“ Schizophrenie: Erkrankungsalter \leq 12 Jahre (Remschmidt/Theisen, 2012; Werry et al., 1991)
- * Adolescent-onset Schizophrenie: Erkrankungsalter \geq 13 Jahre und \leq 17 Jahre (Remschmidt/Theisen, 2012; Werry et al., 1991)

In der vorliegenden Arbeit wird die Definition der Juvenilen = Early-onset Schizophrenie verwendet.

1.3. Epidemiologie und enorme Bedeutung der (Juvenilen) Schizophrenie

Die Lebenszeitprävalenz der Schizophrenie beträgt ca. 1% (Regier et al., 1993). Die Inzidenz (Rate an Neuerkrankungen) bei Erwachsenen ist in den letzten 50 Jahren gleich geblieben und liegt über verschiedene Länder und Kulturen hinweg bei 1-2/10.000 Personen pro Jahr (Remschmidt/Theisen, 2012; Häfner/an der Heiden, 1997).

„Das durchschnittliche Prädektionsalter für den Ausbruch der Erkrankung liegt bei Männern im Alter von 21 Jahren, bei Frauen etwa 5 Jahre später.“ (Möller et al., 2009) Nur ca. 4% aller Schizophreniefälle treten vor dem 15. Lebensjahr auf, ca. 1% vor dem 10. Lebensjahr (Remschmidt/Theisen, 2012). Etwa 10% der Schizophrenien beginnen im Alter zwischen 14 und 20 Jahren und 2/3 aller Schizophreniepatienten sind zwischen 20 und 40 Jahre alt (Remschmidt/Theisen, 2012). In kinder- und jugendpsychiatrischen Kliniken leiden 1 – 2% der Kinder und ca. 5% der Jugendlichen an einer Schizophrenie (Remschmidt/Theisen, 2012).

Mädchen und Jungen sind von der EOS annähernd gleich häufig betroffen (Remschmidt/Theisen, 2012). Eine Studie fand ein Überwiegen des männlichen Geschlechts bei 15 bis 19 Jahre alten Schizophreniepatienten (Remschmidt/Theisen, 2012; Häfner, 2007), eine andere Studie beschreibt eine höhere Inzidenz der Erkrankung bei Jungen im Alter unter 13 Jahren und zwischen 15 und 17 Jahren, jedoch eine höhere Inzidenz bei Mädchen zwischen 13 und 15 Jahren (Remschmidt/Theisen, 2012; Mehler-Wex/Warnke, 2004).

Laut Andreasen ist die Schizophrenie eines der größten Probleme des öffentlichen Gesundheitswesens (Andreasen, 1999). Die Krankheit ist relativ häufig (siehe oben), der Leidensdruck oft enorm („Es gibt andere Todesarten als den Tod - schlimmere“ (Hannah Green, Seite 78)), und die Beeinträchtigung, die die Betroffenen durch die Erkrankung erfahren, betrifft weite Bereiche des privaten und schulischen bzw. beruflichen Lebens. Die meisten Schizophreniepatienten können nicht mehr zur Schule gehen oder arbeiten und sind daher auf die finanzielle Unterstützung des Staates angewiesen (Andreasen, 1999; Ho et al., 1997). Die Kosten für die Gesellschaft belaufen sich auf Billionen von Dollar (Black/Andreasen, 1999). Darüber hinaus haben Schizophreniepatienten eine im Durchschnitt um 20 – 25 Jahre reduzierte Lebenserwartung aufgrund des negativen Einflusses, den die Erkrankung auf die eigene Fürsorge und auf die physische Gesundheit hat (10%-ige Selbstmordrate (Andreasen, 1999) und häufige kardiovaskuläre Ereignisse (Gejman et al., 2011)) (Tihihon et al., 2009).

1. Einleitung

Aufgrund der enormen Bedeutung der Schizophrenie – sowohl für den Einzelnen als auch für die Gesellschaft, ist es nicht verwunderlich, dass das Forschungsinteresse an dieser Erkrankung ungebrochen ist. Gleichzeitig hat auch das wissenschaftliche Interesse an den Ursachen von Schizophrenien zugenommen. Hierbei liegt der Schwerpunkt seit vielen Jahren auf der Erforschung der genetischen Einflüsse auf die Entstehung der Erkrankung.

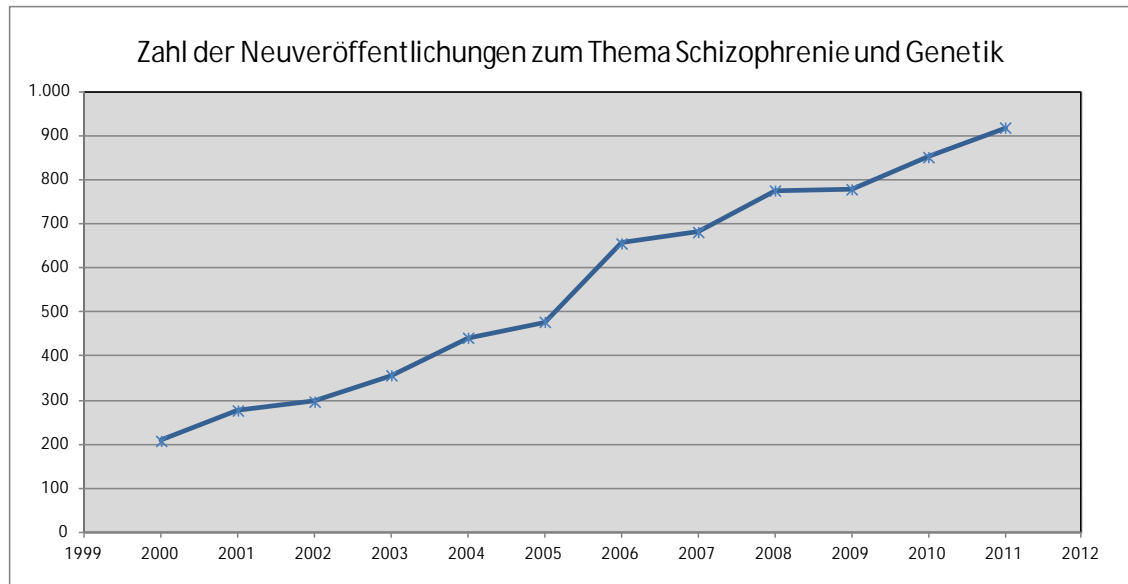


Abb. 1 Steigende Zahl der Neuveröffentlichungen zum Thema Schizophrenie und Genetik von 2000 – 2011 (Idee siehe <http://www.schizophreniaforum.org/whatwewknow/default.asp>)

1.4. Symptome, Diagnosestellung und Differenzialdiagnosen der Juvenilen Schizophrenie

Die Symptome der Schizophrenie können sowohl bei jungen Patienten als auch in der Erwachsenenpsychiatrie in zwei große Kategorien eingeteilt werden:

- * Positivsymptome, hierzu gehören: Halluzinationen, v.a. kritische oder bedrohliche kommentierende oder imperative Stimmen (bei Kindern unter 13 Jahren werden auch optische Halluzinationen beobachtet (Remschmidt/Theisen, 2012)); Wahnvorstellungen, die ohne Bezug zur Realität sind, von deren Wahrhaftigkeit der Betroffene fest überzeugt ist, und die gewöhnlich die Angst zum Inhalt haben, fremde Personen könnten den Erkrankten beobachten, belästigen oder sich gegen ihn verschwören (ein systematisierter Wahn ist bei Kindern unter 12 Jahren sehr selten, bei Jugendlichen häufiger (Remschmidt/Theisen, 2012)); es findet sich eine unorganisierte Sprechweise mit der häufigen Unfähigkeit, eine Konversation aufrecht zu erhalten und bei einem Thema zu bleiben; außerdem sieht man ein unorganisiertes oder katatonisches Verhalten mit z.B. einem ungewöhnlichen und bizarren Verhalten oder einer Unfähigkeit, Aktivitäten organisiert zu planen und zu Ende zu bringen
- * Negativsymptome: ein geringer emotionaler Ausdruck mit einem flachen Affekt; ein Mangel an Energie und Motivation; der Verlust von Freude und der Verlust des Interesses an sämtlichen Aktivitäten inklusive des Verlusts des Interesses an sozialen Kontakten

(nach <http://www.nami.org/>)

1. Einleitung

Positiv- und Negativsymptome können bei Kindern und Jugendlichen manchmal gefunden werden lange bevor die eigentliche Krankheit klinisch manifest wird und zur Krankenhauseinweisung führt (Remschmidt/Theisen, 2012).

Für Kinder und Erwachsene können dieselben ICD-10- und DSM-IV-Diagnosekriterien angewandt werden (Gordon et al., 1994; Green et al., 1992; Russell, 1994; Spencer/Campbell, 1994); die ICD-10- und die DSM-IV-Kriterien fanden auch im Rahmen dieser Dissertation Anwendung:

Tabelle 1 Schizophrene Erkrankungen nach ICD-10 und DSM-IV-TR (aus Möller et al., 2009)

ICD-10	DSM-IV-TR
* Kontrollwahn, Beeinflussungswahn, Wahnwahrnehmung	* Wahn, besonders bizarrer Wahn
* Halluzinationen, besonders kommentierende oder dialogisierende Stimmen	* Stimmungsinkongruente Halluzinationen, besonders kommentierende oder dialogisierende Stimmen
* Gedanken-laut-Werden, Gedankeneingebung, Gedankenentzug, Beeinflussungserlebnisse, Zerfahrenheit, Gedankenabreißen u.a.	* Zerfahrenheit
* Katatone Symptome	* Katatone Symptome
* Negative Symptome wie Apathie, Sprachverarmung, verflachter Affekt	* Affektarmut, Antriebsmangel, sozialer Rückzug
	* Verschlechterung der sozialen Adaptation
* Charakteristische Symptomatik mindestens 1 Monat	* Kontinuierliche Anzeichen der Erkrankung mindestens 6 Monate
* Keine nachweisbare organische Ursache	* Keine nachweisbare organische Ursache
ICD-10 und DSM-IV-TR legen die Diagnose der Schizophrenie durch einen Kriterienkatalog fest. Die Tabelle gibt diesen Katalog in modifizierter Form wieder und soll zeigen, dass es trotz Unterschieden im Detail große Überlappungsbereiche gibt.	

Es gibt keine Labortests für die Diagnose der Schizophrenie; die Diagnosestellung basiert auf klinischen Beobachtungen und auf der Interpretation berichteter und erfragter Symptome (Gejman et al., 2011).

In DSM-IV müssen grundsätzlich mindestens zwei von fünf charakteristischen Symptomen vorhanden sein: Wahnvorstellungen, Halluzinationen, desorganisierte Sprechweise, grob abnormales psychomotorisches Verhalten oder Negativsymptomatik (Corvin, 2011). Handelt es sich um kommentierende oder dialogisierende Stimmen als Halluzinationen oder um Wahnvorstellungen, die bizarr sind, so genügt dieses eine Kriterium zur Diagnosestellung (Corvin, 2011). Zur Diagnosestellung gehört auch der negative Effekt, den diese Symptome auf die soziale und berufliche/schulische Funktion haben (Corvin, 2011).

Je nach Vorherrschen bestimmter Symptome unterscheidet man traditionell bestimmte Subtypen der Schizophrenie, wobei der paranoid-halluzinatorische Typ der häufigste Subtyp ist, und der hebephrene Typ mit seinen v.a. affektiven Störungen insbesondere im Jugendalter auftritt (Möller et al., 2009).

1. Einleitung

Tabelle 2 Klassifikation der Subtypen schizophrener Erkrankungen (aus Möller et al., 2009)

ICD-10	DSM-IV-TR
* Paranoide Schizophrenie* (F20.0)	* Paranoider Typ* (295.30)
* Hebephrener Typ (F20.1)	* Desorganisierter Typ (295.10)
* Katatone Schizophrenie (F20.2)	* Katatoner Typ (295.20)
* Undifferenzierte Schizophrenie* (F20.3)	* Undifferenzierter Typ* ¹⁾ (295.90)
* Postschizophrene Depression (F20.4)	* Residualer Typ (295.60)
* Schizophrenes Residuum (F20.5)	
* Schizophrenia simplex (F20.6)	
*) Trotz gleicher Begriffe ist die Definition in den Klassifikationssystemen unterschiedlich.	

Bevor bei einem Kind oder Jugendlichen die Diagnose einer Schizophrenie gestellt wird, sollten folgende Differenzialdiagnosen in die Überlegungen miteinbezogen werden, v.a. auch deshalb, weil keines der schizophrenen Symptome Schizophrenie-spezifisch ist (Corvin, 2011):

Tabelle 3 Differenzialdiagnosen der EOS (aus Remschmidt/Theisen, 2012)

(1) Autismus
(2) Desintegrative Störung (Heller-Syndrom)
(3) Viele komplexe Entwicklungsstörungen und viele Beeinträchtigungen der normalen Entwicklung
(4) Affektive Psychosen (psychotische Depression, Bipolare Störung)
(5) Asperger-Syndrom
(6) Drogen-induzierte Psychose
(7) Organische Erkrankungen des Gehirns

1.5. Therapie der Juvenilen Schizophrenie

Es gibt wenige evidenzbasierte Studien zur Effektivität antipsychotischer (typischer und atypischer) Medikamente bei EOS-Patienten, was z.T. mit der Seltenheit dieser Patienten zusammenhängt und z.T. damit, dass es schwierig ist, bei schwer betroffenen Kindern/Jugendlichen Behandlungs- und Medikamentenversuche durchzuführen (Vyas/Gogtay, 2012; Gogtay/Rapoport, 2008). Zusammengefasst besagen diese Studien, dass Antipsychotika der 1. Generation (FGAs) die Positivsymptomatik zwar verbessern, gleichzeitig jedoch zu signifikanten extrapyramidalen Nebenwirkungen, tardiven Dyskinesien und Prolaktinerhöhungen führen (Vyas/Gogtay, 2012; Pool et al., 1976; Realmuto et al., 1984; Spencer et al., 1992; Findling et al., 1998). Folglich gelten Antipsychotika der 2. Generation (SGAs oder atypische Neuroleptika) als Mittel der Wahl zur Behandlung der EOS-Patienten, da diese SGAs ein günstigeres Nebenwirkungsprofil haben (Vyas/Gogtay, 2012; Madaan et al., 2008; Masi/Liboni, 2011). Im Cochrane-Review wurden die drei SGAs Clozapin, Risperidon und Olanzapin miteinander verglichen, und die Autoren schlussfolgerten, dass man keinem der drei Medikamente einen Vorzug geben könnte (Kennedy et al., 2007). Hinsichtlich der Effektivität waren die SGAs den FGAs nicht überlegen (Vyas/Gogtay, 2012; Kennedy et al., 2007). Aufgrund der Nebenwirkungen der Antipsychotika kann bei Kindern/Jugendlichen ein therapeutisches Drugmonitoring sinnvoll sein (Remschmidt/Theisen, 2012).

Ebenso wichtig wie die medikamentöse Therapie sind für die Patienten eine psychotherapeutische Behandlung sowie familienorientierte Interventionen und RehaMaßnahmen (Remschmidt/Theisen, 2012).

1. Einleitung

1.6. Prognose der Juvenilen Schizophrenie

Kinder und Jugendliche mit Schizophrenie haben eine schlechtere Prognose als Patienten mit einem Erkrankungsbeginn im Erwachsenenalter. Dies konnte in mehreren Langzeitstudien gezeigt werden (Fleischhaker et al., 2005) und betrifft in erster Linie ein schlechteres psychosoziales Outcome (Röpcke/Eggers, 2005). Die Prognose von COS-Patienten gilt als noch schlechter (Asarnow et al., 2001, 2004).

Eine wichtige Rolle für die Prognose spielt die prämorbid Persönlichkeit der Erkrankten: Kinder und Jugendliche, die vor ihrer Krankheit als sozial aktiv, intelligent und integriert galten, haben eine bessere Prognose als junge Patienten, die vor Krankheitsausbruch bereits intellektuell beeinträchtigt, furchtsam, introvertiert und unkommunikativ waren (Remschmidt/Theisen, 2012). Patienten mit Schizophrenie zeigen prämorbid Auffälligkeiten, die Sprache, Motorik und Sozialverhalten betreffen (Cannon-Spoor et al., 1982; Done et al., 1994; Jones et al., 1994). Lange vor Ausbruch der eigentlichen Erkrankung kann es hier zu Veränderungen kommen, und bei Kindern/Jugendlichen sind diese Veränderungen oft besonders ausgeprägt (Alaghband-Rad et al., 1995; Hollis, 1995). Größere prämorbid Auffälligkeiten sind dabei mit einer schlechteren Prognose verbunden (Gupta et al., 1995).

Tabelle 4 Prädiktoren für einen chronischen, ungünstigen Verlauf der Schizophrenie allgemein

Prädiktor für ungünstigen Krankheitsverlauf (nach Remschmidt/Theisen, 2012; Möller et al., 2009)	Besonderheit des jeweiligen Prädiktors bei Kindern/Jugendlichen mit Schizophrenie; mitunter ergibt sich daraus die insgesamt schlechtere Prognose der Schizophrenien mit frühem Krankheitsbeginn
Schizophrene Psychosen in der Familie	Für die frühen Formen wird eine größere genetische Prädisposition angenommen als für die adulten Formen (Kumra/Schulz, 2008)
Frühes Erkrankungsalter	Im Kindesalter an Schizophrenie erkrankte Patienten haben eine noch schlechtere Prognose als Patienten mit einem Erkrankungsbeginn im Jugendalter (Asarnow et al., 2001, 2004)
Schleichender Beginn der Schizophrenie	Bei Kindern, die eine Schizophrenie entwickeln besonders häufig (z.B. Eggers et al., 2000)
Schlechte psychosoziale Anpassung vor Krankheitsausbruch	Siehe linke Spalte (keine Besonderheit des genannten Prädiktors bei Kindern/Jugendlichen mit Schizophrenie im Vergleich zu adulten Patienten)
Dauer der unbehandelten Psychose	Einerseits fallen prodromale und schizophrene Symptome bei Kindern/Jugendlichen durch deren meist gute Einbindung ins soziale Gefüge (Wohnen bei Eltern, Schule) eher auf als bisweilen bei Erwachsenen, andererseits werden die Symptome häufig verkannt und misinterpretiert (sie werden bei Jugendlichen z.B. auf die pubertale Entwicklung geschoben)
Ungünstiger Zustand bei Entlassung nach Ersthospitalisation (schlechte psychosoziale An-	Siehe linke Spalte (keine Besonderheit des genannten Prädiktors bei Kindern/Jugendlichen

1. Einleitung

passung, viele Krankheitsmanifestationen)	mit Schizophrenie im Vergleich zu adulten Patienten)
Beginn mit hebephrener Symptomatik	Die hebephrene Schizophrenie tritt insbesondere im Jugendalter auf (Möller et al., 2009)
Prämorbid Persönlichkeitsstörung	Junge Schizophreniepatienten zeigen oft besonders ausgeprägte prämorbid Persönlichkeitsveränderungen (Alaghband-Rad et al., 1995; Hollis, 1995; Gupta et al., 1995), siehe auch der vorangegangene Textabschnitt

1.7. Ätiopathogenese der Schizophrenie

1.7.1. Die Schizophrenie – ein multifaktorielles Krankheitsbild

Bei der Schizophrenie handelt es sich um eine Erkrankung, an deren Entstehen und Auftreten viele verschiedene Faktoren maßgeblich beteiligt sind. Neben genetischen und Umweltfaktoren dürften auch metabolische und stochastische Einflüsse eine Rolle spielen (Duan et al., 2010). Die Krankheit ist also komplex und wird multifaktoriell verursacht, d.h. es bedarf des Vorhandenseins und Zusammentreffens mehrerer prädisponierender Elemente. Weitere Beispiele für komplexe Krankheitsbilder, die bei überwiegendem Teil der Erkrankten ebenfalls nicht auf simplen Mendel'schen Regeln beruhen, sind die arterielle Hypertonie, der Diabetes mellitus Typ II, die koronare Herzerkrankung, Alkoholismus und affektive Störungen (Davodyfar, 2006). Da das Gehirn komplexer ist als jedes andere menschliche Organ und unser Wissen über höhere Hirnfunktionen sehr lückenhaft ist, verwundert es nicht, dass die Komplexität des Krankheitsbildes Schizophrenie bisher nur sehr unvollständig verstanden ist (Gejman et al., 2010).

Es gibt eine Vielzahl von Umweltfaktoren, welche in Verdacht stehen, das Auftreten einer Schizophrenie zu begünstigen. Einfluss auf die Krankheitsentstehung wird z.B. bei pränatalen und perinatalen Ereignissen (v.a. Infektionen der Mutter während der Schwangerschaft oder hypoxische Zustände des Feten/Neugeborenen), einer Geburt oder einem Wohnort in der Stadt, einem Migrantenstatus, einer Geburt im späten Winter oder im Frühjahr (über maternale Infektionen wie z.B. Influenza), einem männlichen Geschlecht, einem höheren Alter des Vaters sowie einem Substanzmissbrauch, hier v.a. einem Cannabisabusus (Malaspina et al., 2001; Torrey et al., 2009; Gejman et al., 2010; van Os/Kapur, 2009; Sullivan et al., 2003; Hettema et al., 1996) diskutiert. Darüber hinaus gibt es sicherlich noch eine Reihe weiterer, bisher unbekannter Umweltfaktoren, welche zur Pathogenese der Schizophrenie beitragen.

Als ein sehr bedeutender Umweltfaktor gelten – wie eben schon angedeutet – entzündliche Prozesse. Bei entzündlichen Prozessen, zu denen eben auch maternale Infektionen und Geburtskomplikationen gehören, kommt es zur Ausschüttung von Zytokinen ins Blut, die bei noch unreifer Blut-Hirnschranke von peripher nach zentral ins Gehirn wandern können, dort zu Entzündungssignalen führen und die strukturelle und phänotypische Gehirnentwicklung beeinträchtigen können (Watanabe et al., 2010). Bei Schizophreniepatienten konnten sowohl im Blut als auch im Gehirn erhöhte Zytokinkonzentrationen (epidermaler Wachstumsfaktor, Interleukine, Neuregulin-1) nachgewiesen werden, und Versuchstiere, die als Embryos oder Neugeborene mit spezifischen Zytokinen behandelt wurden, entwickelten nach der Pubertät Schizophrenie-ähnliche Verhaltensauffälligkeiten (Watanabe et al., 2010). Auch ein gehäuftes Auftreten von Autoimmunerkrankungen bei Schizo-

1. Einleitung

phreniepatienten wird beobachtet (z.B. Eaton et al., 2006), und eine Beteiligung endogener retroviral-er Elemente aus dem Patientengenom wird diskutiert (Yolken et al., 2000).

Der genaue Mechanismus, wie Gene und Umweltfaktoren miteinander interagieren (GxE-Interaktionen) und wie Umweltfaktoren untereinander interagieren (ExE-Interaktionen), um die Krankheit Schizophrenie auszulösen, ist derzeit noch unklar. Man geht von einer, durch Gene und Umwelt bestimmten Krankheitsprädisposition aus; verschiedene Triggerfaktoren wie z.B. emotionale Traumata, sozialer Stress oder halluzinogene Drogen lassen die Erkrankung dann manifest werden (Möller et al., 2009). Eine Möglichkeit, wie Umwelt und Gene bei der Krankheitsentstehung zusammenwirken, sind epigenetische Mechanismen, d.h. Umweltfaktoren steuern die Expression von Genen über z.B. die Methylierung des 5' Cytosins in der DNA-Sequenz des Gen-Promotors (v.a. Verminderung der Genexpression) oder die Azetylierung des Lysins in Histon-Enden (erleichterte Gen-Transkription durch aufgelockerte Chromatinstruktur) (Maric/Svrakic, 2012). Auch die Genexpression reifer, differenzierter somatischer Zellen kann so durch Umweltfaktoren gesteuert werden, wobei epigenetische Markierungen durch Umwelteinflüsse auch reversibel sind; so könnten sich durch eine Modifikation negativer Umwelteinflüsse präventive und therapeutische Möglichkeiten für Schizophrenie ableiten lassen (Maric/Svrakic, 2012).

Auch die Pathogenese, d.h. die Art und Weise, wie (über welche molekularen Mechanismen) die genannten möglichen Auslösefaktoren zur Erkrankung Schizophrenie führen, ist zum großen Teil noch ungeklärt. „Pathophysiologische Modelle beinhalten die Dopamin-Überschuss- sowie Glutamat-Mangel-Hypothese, die Radikal-Hypothese und die Hypothese entwicklungsbedingter versus degenerativer Genese.“ (Mehler-Wex/Renner, 2008) Für eine entwicklungsbedingte Hypothese spricht z.B. die Nachweisbarkeit initialer, primärer Ventrikelvolumenerweiterungen (und anderer ZNS-Auffälligkeiten) bei jungen Schizophreniepatienten, deren multiple prämorbid Auffälligkeiten (motorische Soft Signs, sprachliche Entwicklungsverzögerungen, neuropsychologische Defizite) (Mehler-Wex/Renner, 2008) und insbesondere auch das Mikrodeletion 22q11.2-Syndrom, dem Kapitel 1.7.3. gewidmet ist, siehe dort. Eine synaptische Dysfunktion und eine veränderte neuronale Konnektivität scheinen wichtige Parameter der Pathogenese zu sein (Rodriguez-Murillo et al., 2012).

1.7.2. Genetik

1.7.2.1. Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien

Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien machen den großen Einfluss der Gene auf die Krankheitsätiologie der Schizophrenie deutlich:

Familienstudien:

„Familienstudien zeigen, dass das Risiko, die Krankheit zu entwickeln, mit zunehmender genetischer Verwandtschaft zu einer schizophrenen Person zunimmt (McGuffin et al., 1995).“ (Gonnermann, 2004). So haben Verwandte dritten Grades ein Risiko von ca. 2%, Verwandte zweiten Grades ein Risiko von 6% und Verwandte ersten Grades ein Risiko von bis zu 9%, selbst an einer Schizophrenie zu erkranken (bei Zwillingen ist das Risiko noch höher, siehe unten) (Tsuang et al., 2001; Gonnermann, 2004). Eine Person, bei der beide Elternteile an einer Schizophrenie leiden, besitzt ein Erkrankungsrisiko von sogar 46% (Fabisch et al., 2005).

1. Einleitung

Zwillingsstudien:

Zwillingsstudien vergleichen die Konkordanzraten monozygoter (weitgehende genetische Identität) und dizygoter (50% gemeinsame Gene) Zwillinge. Sie zeigen, dass genetische Einflüsse einen bedeutenden Beitrag zur familiären Häufung der Schizophrenie leisten (Gonnermann, 2004). Bei monozygoten Zwillingen (MZ) beträgt die Konkordanzrate (d.h. das Risiko, dass auch der andere Zwilling erkrankt) 48%, wohingegen dizygote Zwillinge (DZ) eine Konkordanzrate von „nur“ 17% aufweisen (Fabisch et al., 2005). Dies macht die Bedeutung der Genetik für die Ätiologie der Schizophrenie deutlich. „Für die Konkordanzrate von lediglich 50% bei monozygoten Zwillingen trotz deren genetischer Identität werden u.a. eine inkomplette Penetranz genetischer Information, Neumutation oder ein unterschiedliches Mikromilieu beider Zygoten mit epigenetischen Folgewirkungen als mögliche Ursachen diskutiert.“ (Fabisch et al., 2005) Auch der zusätzliche Einfluss von Umweltfaktoren wird damit deutlich, wobei MZ nicht nur die Gene, sondern auch die Umweltfaktoren betreffend mehr Gemeinsamkeiten besitzen als DZ (Gonnermann, 2004). So sind MZ z.B. vorwiegend den gleichen pränatalen Einflüssen ausgesetzt, haben das gleiche Geschlecht und erfahren trotz unterschiedlicher Persönlichkeiten ähnliche Reaktionen aus der Umwelt (Gonnermann, 2004; Reiss et al., 1991). Somit könnte bei MZ die Heritabilität der Schizophrenie überschätzt werden (Gonnermann, 2004). Als hohes Indiz für die Heritabilität gilt jedoch wiederum die Beobachtung, dass bei für die Schizophrenie diskordanten MZ die Kinder des gesunden monozygoten Zwillings genauso häufig an Schizophrenie erkranken wie die Kinder des schizophren erkrankten monozygoten Zwillings (Fabisch et al., 2005).

Adoptionsstudien:

Adoptionsstudien bestätigen die wichtige Bedeutung der Gene bei der Schizophrenieentstehung. Kinder von Schizophreniepatienten, die in gesunde Familien adoptiert werden, nehmen das erhöhte Risiko, selbst an Schizophrenie zu erkranken in diese Familien mit, wohingegen Kinder, die aus gesunden Familien in Schizophreniefamilien kommen, kein erhöhtes Risiko entwickeln, nun selbst zu erkranken (Kendler et al., 1994; Kety et al., 1994).

1.7.2.2. Methoden der genetischen Forschung

Karyotypisierung, Kopplungsuntersuchungen, Assoziationsstudien und genomweite Sequenzierungen sind Methodiken, die angewandt werden, um nach chromosomalen und genetischen Veränderungen zu suchen, die für die Schizophrenie verantwortlich sein könnten. Bruchpunktanalysen bei strukturellen Chromosomenaberrationen können zur Identifizierung neuer Kandidatengene führen.

Karyotypisierung:

Die Karyotypisierung dient dazu, eventuell vorhandene strukturelle und numerische Chromosomenaberrationen (bei schizophrenen Patienten) aufzudecken. Sie kann Ausgangspunkt für Assoziationsstudien sein, wenn bei mehreren unverwandten schizophrenen Patienten die gleichen Auffälligkeiten gefunden werden, die somit möglicherweise ursächlich mit der Schizophrenie in Zusammenhang stehen könnten.

Kopplungsuntersuchungen (Linkage-Analysen):

Für Kopplungsuntersuchungen gilt:

„Infolge von crossing over und Rekombination ist die Wahrscheinlichkeit für eng benachbarte Gene, gemeinsam vererbt zu werden, größer als für auf einem Chromosom weiter voneinander entfernte Gene. Diese Vorgabe der Natur wird bei Kopplungsuntersuchungen (in Form von Kandidaten-

1. Einleitung

genansätzen oder systematischen Genomscans) benutzt: Loci, auf denen sich mögliche krankheitsrelevante Mutationen („Kandidatengene“) oder DNA-Marker (Mikrosatelliten bei einem systematischen Genomscan) befinden, werden hinsichtlich einer möglichen Kopplung mit Verhaltensmerkmalen bzw. Symptomclustern (dem vermeintlichen phänotypischen Ausdruck der gesuchten Mutation) über mehrere Generationen des Stammbaums des erkrankten Individuums untersucht. Die Kopplungsstärke wird in Zahlenwerten des LOD-Score angegeben. Eine Effektgröße zwischen 2 und 3 wird als Anzeichen für eine Kopplung interpretiert, Werte von ≥ 3 gelten als deutlicher Hinweis. Es gibt mittlerweile Anhaltspunkte, dass Loci mit einer Effektgröße > 3 in mehrfach affizierten Familien gefunden werden können [Kirov et al., 2005]. Regionen mit positiver Kopplung sind aber oft relativ breit, so dass mitunter Hunderte von Genen dort lokalisiert sein können. Somit gibt ein erfolgreiches Linkage nur den ungefähren Ort an, an dem sich die gesuchte Mutation befindet. Mithilfe des positionellen Klonierens und/oder gezielter Datenbanksuche kann diese Region auf eine kleinere Zahl von Kandidatengenloci eingegrenzt werden und unter anderem durch Bestimmung der Nukleotidsequenz dieser Gene bei Patienten eine relevante Mutation gesucht werden.“ (Fabisch et al., 2005)

Assoziationsstudien:

Assoziationsstudien können den Ort besser (als Kopplungsstudien) eingrenzen, an dem sich eine potenziell relevante Mutation befindet (Fabisch et al., 2005).

„In Assoziationsstudien wird durch den Vergleich einer großen Patientenstichprobe mit einer Kontrollstichprobe erfasst, ob ein DNA-Polymorphismus in einem Kandidatengen oder auch nur in einem spezifischen Genomabschnitt bei schizophrenen Symptomen bzw. Symptomclustern häufiger auftritt. Als Kandidatengen gelten Gene für ein pathogenetisch möglicherweise relevantes Phänomen, wobei über die Lokalisation des Gens unter anderem Kopplungsstudien, funktionelle Studien mit anschließender Genkartierung oder bestimmte strukturelle Chromosomenaberrationen bei entsprechendem Phänotyp Aufschlüsse geben können. Die Anzahl potenzieller Kandidatengene ist sehr groß.“ (Fabisch et al., 2005) „Für die Untersuchung müssen keine genetisch verwandten Personen herangezogen werden. Für die Validität der Ergebnisse ist aber darauf zu achten, die Stichproben aus derselben ethnischen Gruppierung zu rekrutieren, da sich in ethnisch verschiedenartigen Populationen Unterschiede in der Häufigkeit und Verteilung von genetischen Merkmalen finden [Propping et al., 1994].“ (Fabisch et al., 2005)

Großer Vorteil der Assoziations- im Vergleich zu den Kopplungsstudien ist, dass man hier nicht auf die Verfügbarkeit großer Stammbäume mit vielen Betroffenen angewiesen ist, die bei der Schizophrenie auch selten sind. Die Heterogenität der Schizophrenie mit mehr als 1000 vermuteten Suszeptibilitätsgenen (Girard et al., 2011) erschwert darüberhinaus die Auswertung der Kopplungsstudien und erfordert die (Meta-)Analyse einer Vielzahl von Familienstammbäumen. Für eine Assoziationsstudie wird ein bestimmtes Gen von Interesse benötigt, dessen pathogenetische Relevanz untersucht werden soll. Es handelt sich hier also um eine andere Fragestellung als bei den Kopplungsuntersuchungen. Assoziationsstudien können von pathogenetischen Hypothesen bzw. Vor-Ergebnissen von z.B. Kopplungsstudien profitieren, so dass sich diese beiden Methoden ergänzen können. Inzwischen werden Assoziationsstudien allerdings Hypothesen-frei durchgeführt, was die Verfügbarkeit eines großen Patientenkollektivs und einer Vielzahl zu untersuchender Marker erfordert.

Bei der Mikrodeletion 22q11.2-Analyse und der *CHRNA4*-776ins3-Genanalyse, um die es in dieser Arbeit geht, handelt es sich um Hypothesen-gestützte Assoziationsstudien.

1. Einleitung

Genomweite Untersuchungen:

Zu den Themen GWAS (= genomweite Assoziationsstudien), CNV (= copy number variant)-Studien, Genexpressionsstudien und Sequenzierungsanalysen siehe Diskussionsteil, Kapitel 5.6.1..

1.7.2.3. Molekulargenetik und genetische Architektur der Schizophrenie

Wie bereits aus dem Abschnitt über Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien hervorgeht, spielen genetische Faktoren bei der Krankheitsentstehung die entscheidende Rolle. Eine groß-angelegte schwedische Studie und eine Metaanalyse von Zwillingsstudien schätzen die Heritabilität der Schizophrenie auf 64 – 81% (Lichtenstein et al., 2009; Sullivan et al., 2003). Trotz dieser großen Heritabilität sind die meisten Schizophreniefälle jedoch nicht familiärer, sondern sporadischer Natur (Lichtenstein et al., 2009; Tandon et al., 2008). Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Erkrankung zumeist im Jugend- oder frühen Erwachsenenalter beginnt und sich negativ auf Partnersuche und Familienplanung auswirkt.

Bereits seit den 1980-er Jahren wird die Entdeckung von Schizophreniegenen verfolgt (Gonnermann, 2004). Erschwert werden diese Anstrengungen durch eine enorme phänotypische Variabilität des Krankheitsbildes Schizophrenie, durch das Fehlen einer gut definierten, fokalen und spezifischen mikroskopischen Neuropathologie (Gejman et al., 2010) sowie durch die Tatsache, dass das komplexe Organ Gehirn und die komplexen, der Schizophrenie zugrunde liegenden neuronalen Substrate (Veränderungen innerhalb des ZNS) eine große Zielscheibe für verschiedenste Genveränderungen bieten (Rodriguez-Murillo et al., 2012). Obwohl in den letzten Jahren rasante Fortschritte bei der Entdeckung chromosomaler Loci und pathologischer Genvarianten erzielt wurden, die zur Schizophreniesuszeptibilität führen (siehe Kapitel 1.7.2.4.), tappt man bei den molekulargenetischen Mechanismen der Schizophrenie immer noch weitestgehend im Dunkeln.

Im Hinblick auf die genetische Architektur der Schizophrenie gibt es zwei Hypothesen, die von Bedeutung sind: die CDCV- oder CDCA- (common disease – common variant bzw. allele) Hypothese und die CDRV- oder CDRA- (common disease – rare variant bzw. allele) Hypothese.

Lange Zeit wurde die CDCV-Hypothese vertreten, die davon ausgeht, dass die Schizophrenie eine polygene Erkrankung ist, bei der viele verschiedene und in der Bevölkerung häufige Genvarianten additiv oder synergistisch zusammenwirken und somit die Krankheit auslösen (Rodriguez-Murillo et al., 2012; Mitchell/Porteous, 2011). Jede der häufigen Genvarianten besitzt dabei per se nur einen kleinen bis moderaten krankheitsauslösenden Effekt (Rodriguez-Murillo et al., 2012). Für die CDCV-Hypothese spricht, dass man bei engen gesunden Verwandten von Schizophreniepatienten ebenfalls neurophysiologische Defizite (z.B. die Präpulsinhibition bei Schreckreaktionen betreffend) und neurokognitive Defizite finden kann (Cadenhead et al., 2000; Sitskoorn et al., 2004).

Die CDRV-Hypothese, die in der letzten Zeit beliebter geworden ist, geht davon aus, dass individuelle seltene – v.a. de novo – Genmutationen mit einem jeweils relativ starken Effekt die Krankheit Schizophrenie bedingen (Rodriguez-Murillo et al., 2012). Das Auftreten von de novo-Varianten wird bei der CDRV-Hypothese gefordert (und konnte auch nachgewiesen werden), um die anhaltend hohe Prävalenz der Schizophrenie trotz eines großen natürlichen Selektionsdrucks zu erklären (Rodriguez-Murillo et al., 2012). Bei der CDRV-Hypothese kommt der Begriff der genetischen Heterogenität ins Spiel, der besagt, dass unterschiedliche Genveränderungen zum gleichen Phänotypen führen können. Im Gegensatz zu einigen anderen komplexen Krankheitsbildern konnte für die Schizophrenie (bisher) keine seltene Genmutation gefunden werden, die mit einer 100%-igen Penetranz und damit Mendel'schen Regeln entsprechend, zur Krankheitsmanifestation führt, was ent-

1. Einleitung

scheidende Einblicke in die Ätiopathogenese und Molekulargenetik der Schizophrenie gewähren würde (Kim et al., 2011).

Aktuellen Studien zufolge wird heute zumeist eine kombinierte Form der beiden eben beschriebenen Hypothesen postuliert, meistens dahingehend, dass eine seltene Genmutation mit großem Krankheitseffekt (wie z.B. die Mikrodeletion 22q11.2) gefordert wird, und ein bestimmter genetischer Hintergrund mithinzukommt, was dann einen Risiko-Genotypen erzeugt (Mitchell/Porteous, 2011). Zum genetischen Hintergrund gehören v.a. häufige Genvarianten mit jeweils schwachem pathogenem Effekt, aber auch andere seltene Mutationen (Mitchell/Porteous, 2011). Gemeinsam mit z.B. negativen Umwelteinflüssen kommt es ausgehend vom Risiko-Genotypen zu primären Zelldefekten, die letztendlich zu defekten neuronalen Systemen und damit zur Schizophrenie führen (Mitchell/Porteous, 2011).

„Bisher sind für Schizophrenie die Anzahl an prädisponierenden Genorten, das von jedem Genort übertragene anteilige Risiko und der Grad der Wechselwirkung zwischen den Genorten unbekannt.“ (Gonnermann, 2004)

Ziel der vollständigen Identifikation der Krankheitsgene ist es, einen oder mehrere „Schlüssel“ im Verständnis der molekularen Schizophreniepathogenese zu finden, was wiederum Voraussetzung für die Entwicklung neuer effektiver präventiver und therapeutischer Strategien ist.

1.7.2.4. Kandidatengene

Tabelle 5 zeigt eine Zusammenfassung wichtiger Suszeptibilitätsgene für Schizophrenie. Auf einige davon, die in der aktuellen Literatur viel zitiert werden, soll in diesem Kapitel im Anschluss an die Übersicht kurz eingegangen werden. Auch in den Kapiteln 1.7.3.3. und 5.3.2.1. werden Kandidatengene für Schizophrenie im Kontext besprochen.

Tabelle 5 Zusammenfassung wichtiger Suszeptibilitätsgene für Schizophrenie

Die fett-markierten Gene stellen „Top“-Kandidatengene der Schizophrenie nach SZGene (<http://www.szgene.org>) dar, blau gekennzeichnet sind die Gene, die in dieser Dissertation besprochen werden

Chromosom	Kandidatengene
1	MTHFR (1p36.22), GRIK3 (1p34.3), PDE4B (1p31.3), RGS4 (1q23.3), ASTN1 (1q25.2), GLUL (1q25.3), IL10 (1q32.1), PLXNA2 (1q32.2), DISC1 (1q42.2)
2	IL1B (2q13), ZNF804A (2q32.1)
4	CCKAR (4p15.2)
5	GABRB2 (5q34)
6	DTNBP1 (6p22.3), HIST1H2BJ (6p22.1), PRSS16 (6p22.1), PGBD1 (6p22.1), RPP21 (6p21.33), NOTCH4 (6p21.32), MDGA1 (6p21.2), AHI1 (6q23.3), C6orf217 (6q23.3)
7	RELN (7q22.1)
8	PPP3CC (8p21.3), SLC18A1 (8p21.3), NRG1 (8p12)
10	ANK3 (10q21), GWA_10q26.13
11	DRD4 (11p15.5), TPH1 (11p15.1), GWA_11p14.1 , DRD2 (11q23.1), NRGN (11q24.2), OPCML (11q25)
12	GRIN2B (12p13.1), DAO (12q24.11)
13	HTR2A (13q14.13), DAOA (13q33.2)
14	AKT1 (14q32.33)

1. Einleitung

16	<i>GWA_16p13.12, RPGRIP1L</i> (16q12.2), <i>HP</i> (16q22.3)
17	<i>SRR</i> (17p13.3)
18	<i>TCF4</i> (18q21.2)
19	<i>APOE</i> (19q13.32)
22	<i>COMT, DGCR2, DGCR14, GNB1L, GSCL, PRODH, UFD1L, ARVCF, CLDN5, TBX1, ZDHHC8</i> (alle 22q11.2)

NOTCH4:

NOTCH4 ist eines von wenigen Genen, dessen vermutete Assoziation mit der Schizophrenie in GWAS mit einer genomweiten Signifikanz bestätigt werden konnte (Shayevitz et al., 2012). Die SNPs mit der größten Signifikanz sind rs3131296 und rs2071287 (Allen et al., 2008).

NOTCH4 (= neurogenic locus notch homolog protein 4) ist ein Mitglied der *NOTCH*-Genfamilie, die die Zelldifferenzierung steuert und kontrolliert, ob sich eine Zelle überhaupt differenziert oder ob sie undifferenziert bleibt (Shayevitz et al., 2012). Ein Defekt in der NOTCH-Signalgebung kann zu einer Reihe von Erkrankungen wie z.B. CADASIL (= cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy syndrome; *NOTCH1* und *NOTCH3*) oder der Akuten T-Zell-Leukämie führen (Shayevitz et al., 2012; Fiuza/Arias, 2007). Leider ist die molekulare Pathophysiologie der *NOTCH4*-Varianten, die mit der Schizophrenie assoziiert sind, noch weitestgehend unbekannt (Shayevitz et al., 2012). Die Sequenzvariation des jeweiligen SNPs erlaubt es jedoch Rückschlüsse auf die potenziellen Einschränkungen des NOTCH4-Proteins zu ziehen (Shayevitz et al., 2012). So führt rs3131296 zu drei neuen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren und damit möglicherweise zu einer Überexpression von *NOTCH4* in einer kritischen Phase neuronaler Entwicklung (Shayevitz et al., 2012). Auch das Splicing der Gen-Transkripte scheint bei rs3131296 und rs2071287 betroffen zu sein (Shayevitz et al., 2012; Morais/Valcarel, 2010). Aufgabe für die Zukunft ist zu beweisen, dass die gefundenen Polymorphismen molekulare und zelluläre Phänotypen hervorbringen, die für die Erkrankung der Schizophrenie relevant sind (Shayevitz et al., 2012).

RELN:

RELN kodiert für Reelin. Bei Reelin handelt es sich um ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix, welches für die Zellmigration und für den Aufbau der zerebralen Zytoarchitektur während der Gehirnentwicklung wichtig ist; es spielt jedoch auch im reifen Gehirn eine große Rolle, indem es für die Aufrechterhaltung der synaptischen Funktion zuständig ist (Folsom/Fatemi, 2013).

Für Schizophrenie, aber auch für einige andere neuropsychiatrische Erkrankungen wie z.B. Autismus, Depression, M. Alzheimer konnte eine abnorme Expression von Reelin im Gehirn betroffener Patienten nachgewiesen werden, die für die kognitiven Einschränkungen der genannten Krankheiten (mit-)verantwortlich sein könnte (beeinträchtigte neuronale Konnektivität und synaptische Plastizität) (Folsom/Fatemi, 2013). Möglicherweise könnte eine *RELN*-Genmutation, aber auch eine pränatale Infektion, epigenetische Faktoren oder andere Mechanismen die veränderte Reelin-Expression bedingen (Folsom/Fatemi, 2013).

Positive Assoziationen zwischen *RELN* und einem erhöhten Risiko für Schizophrenie konnten geschlechtsspezifisch (Folsom/Fatemi, 2013; z.B. Ben-David et al., 2010 oder Kuang et al., 2011) gefunden werden, oder wenn *RELN*-Varianten mit denen weiterer Gene kombiniert wurden (Hall et al., 2007). Auch ein Zusammenhang zwischen *RELN* und spezifischen Verhaltensauffälligkeiten bei Schizophrenie konnte gezeigt werden (Folsom/Fatemi, 2013; Greenbaum et al., 2011; Wedenoja et al., 2008, 2010), und Tierversuche weisen ebenfalls darauf hin, dass Defekte in der Reelin-Signalgebung zu schizophrenen Symptomen führen können (Folsom/Fatemi, 2013).

1. Einleitung

ANK3:

Es gibt Hinweise darauf, dass eine gestörte neuronale Konnektivität an der Krankheitsentstehung der Schizophrenie beteiligt sein könnte (Yuan et al., 2012). *ANK3* kodiert für Ankyrin 3 und ist beteiligt an der Verankerung spannungsgesteuerter Natriumkanäle im Bereich der Ranvier'schen Schnürringe eines Neurons und an der Aufrechterhaltung der Verbindung zwischen Axolemm und Myelinscheide (Yuan et al., 2012; Poliak/Peles, 2003; Konrad/Winterer, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *ANK3* bei Patienten mit Schizophrenie signifikant erniedrigt ist (Yuan et al., 2012).

Eine kürzlich veröffentlichte GWA-Studie und Replikationsstudie hat eine Assoziation des *ANK3*-SNPs rs10761482 mit Schizophrenie in einer norwegischen Studienpopulation gezeigt (Athanasou et al., 2010), ein Befund, der sich bei deutschen schizophrenen Patienten nicht replizieren ließ (Gella et al., 2011). Der Polymorphismus rs10994336 des *ANK3*-Locus konnte in zwei Metaanalysen mit der BD (Ferreira et al., 2008; Schulze et al., 2009) und in der Fall-Kontroll-Studie von Yuan et al., 2012 auch mit der Schizophrenie assoziiert werden. Weitere Studien sind ausstehend.

TCF4:

Das *TCF4*-Gen kodiert für einen sogenannten basic Helix-Loop-Helix (bHLH)-Transkriptionsfaktor der Klasse I, der in vielen menschlichen Geweben vorkommt (Navarrete et al., 2013). *TCF4* (z.B. auch *ITF2*, *E2-2* oder *SEF-2* genannt) spielt wahrscheinlich u.a. eine wichtige Rolle bei der neuronalen Entwicklung und ist an der Differenzierung von Gliazellen beteiligt (Navarrete et al., 2013). *TCF4* interagiert mit mehreren Klasse II-bHLH-Transkriptionsfaktoren, von denen man weiß, dass sie für die Entwicklung des Nervensystems zuständig sind (Navarrete et al., 2013).

Aktuell kennt man zwei genetische Loci bei *TCF4*, die mit der Schizophrenie in Zusammenhang stehen, der eine in Intron 3 des Gens, der andere zwischen dem distalen Ende von *TCF4* und dem Gen *CCDC8* (genomweite signifikante Ergebnisse) (Navarrete et al., 2013; Stefansson et al., 2009; Ripke et al., 2011; Steinberg et al., 2011). Auch eine zytogenetische Studie mit einer perizentrischen Inversion von Chromosom 18 nahe bei *TCF4* (Pickard et al., 2005), eine Blut- und eine postmortem-Untersuchung an schizophrenen Patienten mit veränderten *TCF4*-Spiegeln (Kurian et al., 2011 und Mudge et al., 2008) sowie positive Assoziationsstudien von *TCF4*-Polymorphismen mit vermutlichen Endophänotypen der Schizophrenie (z.B. Quednow et al., 2012) deuten auf die Rolle von *TCF4* bei der Schizophrenieentstehung hin. Darüber hinaus ist das *TCF4*-Gen ein Ziel-punkt für die sogenannten miRNAs, so auch für die miRNA mir-137, die ebenfalls mit der Schizophrenie in genomweitem signifikantem Zusammenhang steht (Navarrete et al., 2013; Ripke et al., 2011).

COMT und PRODH:

Siehe Kapitel 1.7.3.3..

1.7.3. Risikofaktor Mikrodeletion 22q11.2

Mit der Mikrodeletion 22q11.2 besteht die erste eindeutige Verbindung zwischen einer chromosomalen Auffälligkeit und Schizophrenie (Karayiorgou/Gogos, 2004).

1. Einleitung

1.7.3.1. 22q11.2-Deletionssyndrom (22q11.2DS)

Die Mikrodeletion 22q11.2 ist eine der häufigsten interstitiellen chromosomalen Deletionen beim Menschen (Sieberer et al., 2006). Sie ist nach dem Down-Syndrom das, am zweithäufigsten diagnostizierte chromosomale Syndrom (Bassett/Chow, 1999).

Die Prävalenz wird in der Literatur mit 1:2000 bis 1:7000 angegeben (Shprintzen, 2008). Da einige Fälle aufgrund eines bisweilen milden Phänotyps erst spät bzw. gar nicht diagnostiziert werden, schätzt Shprintzen die tatsächliche Prävalenz der Mikrodeletion 22q11.2 auf ca. 1:1600 (Shprintzen, 2008). Die Inzidenz der Erkrankung übertrifft die Prävalenz, da es schwer betroffene Feten und Neugeborene gibt, die mit dieser Mikrodeletion nicht lebensfähig sind (Shprintzen, 2008).

„In etwa 85 – 90% aller Fälle liegt eine Neumutation vor, in den übrigen Fällen wird die genetische Veränderung autosomal dominant auf das Kind übertragen, zumeist von der Mutter (Ryan et al., 1997; Swillen et al., 1998).“ (Briegel/Cohen, 2004) Ursächlich für diese hohe Rate an Neumutationen sind sogenannte LCRs (= Low Copy Repeats, repetitive und sehr homologe DNA-Elemente (Maynard et al., 2002; Edelmann et al., 1999a, b; Shaikh et al., 2000, 2001)). Durch eine fehlerhafte Ausrichtung dieser LCRs kommt es während der Oogenese bzw. Spermatogenese zu einer fehlerhaften allelischen Rekombination, was in einer Deletion oder auch Duplikation resultieren kann (Maynard et al., 2002; Philip/Bassett, 2011).

87% der Mikrodeletion 22q11.2-Patienten weisen den gleichen, 3 Mb großen Deletionsbereich auf, der daher als „typisch“ bezeichnet wird; 8% haben eine kleinere, 1.5 Mb messende Deletion mit gleicher proximaler Bruchstelle wie die größere Deletion; 4% der Patienten zeigen einen von zwei selteneren Deletionsbereichen und die restlichen 1% haben unikale Deletionen (Shaikh et al., 2000; Shprintzen, 2008; Ivanov et al., 2003).

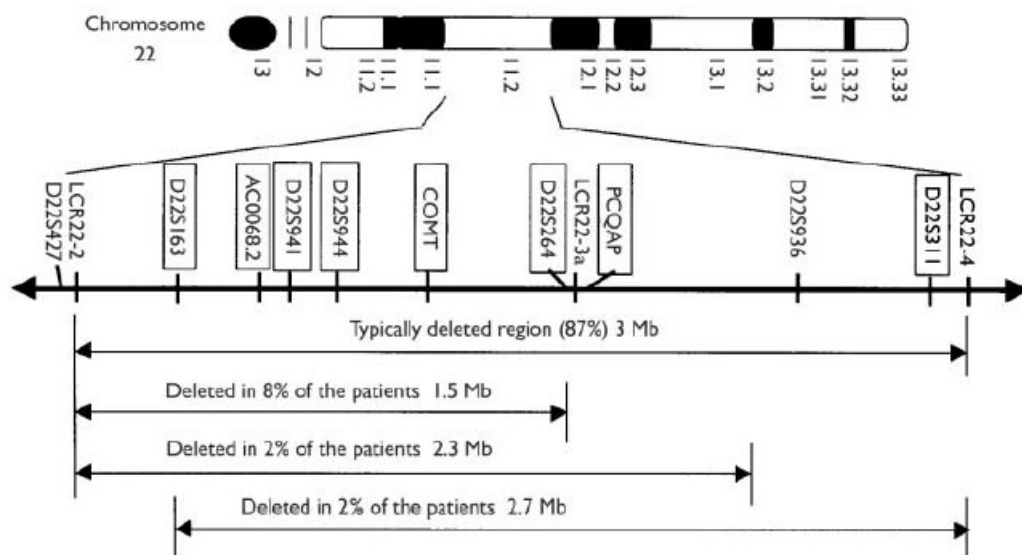


Abb. 2 Verteilung der unterschiedlichen Deletionsgrößen beim 22q11.2DS (aus Ivanov et al., 2003)

Dargestellt sind ebenfalls die bei Ivanov et al., 2003 genotypisierten Mikrosatelliten-Marker der Region 22q11.2, siehe hierzu auch das Kapitel 5.4.3.1.; LCR, low copy repeat

Zwischen der Deletionsgröße und dem klinischen Phänotyp der Mikrodeletion 22q11.2 gibt es keinen klaren Genotyp-Phänotyp-Zusammenhang (Carlson et al., 1997; Morrow et al., 1995). Die Variabilität des Phänotyps ist beträchtlich; so gibt es ca. 180 Symptome, die im Zusammenhang mit der Mikrodeletion 22q11.2 beschrieben wurden, und die nahezu jedes Organsystem betreffen kön-

1. Einleitung

nen (Robin/Shprintzen, 2005; Shprintzen, 2005a,b; VCFS Educational Foundation, 2007; Briegel/Cohen, 2004). Keines der Symptome kommt in 100% der Fälle vor, und kein Patient hat alle oder die meisten der beschriebenen Symptome (Shprintzen, 2008). Es ist daher nicht verwunderlich, dass es eine Reihe verschiedener Syndrome und Syndromnamen gibt, die alle auf eine Mikrodeletion 22q11.2 zurückzuführen sind (Shprintzen, 2008): Velo-Cardio-Faziales Syndrom (VCFS) oder Shprintzen-Syndrom (Driscoll et al., 1992), DiGeorge-Syndrom, Cayler-Syndrom, Takao-Syndrom, Sedláčková-Syndrom, CATCH22, conotruncal anomaly face syndrome (Shprintzen, 2008; Robin/Shprintzen, 2005; Shprintzen, 2005b). Zur Vereinheitlichung wurde der Begriff „22q11.2-Deletionssyndrom“ (22q11.2DS) (Sieberer et al., 2006) (oder kurz „Mikrodeletion 22q11.2“) eingeführt.

Die häufigsten und charakteristischsten somatischen Symptome des 22q11.2DS sind (Sieberer et al., 2006; Ryan et al., 1997; Briegel/Cohen, 2004):

- * kongenitale Herzfehler (bei 75% der Patienten), typischerweise konotrunkale Defekte wie z.B. Fallot'sche Tetralogie (20%) oder Ventrikelseptumdefekt (14%) (McDonald-McGinn et al., 1999); sie sind bei Mikrodeletion 22q11.2-Patienten die Haupttodesursache
- * geringe Körpergröße bzw. Minderwuchs (bei 40% der Patienten), meist infolge Wachstums-hormonmangels (Weinzimer et al., 1998)
- * Gaumenfehlbildungen: Gaumenspalte (bei 10%), velopharyngeale Insuffizienz (bei ca. 70%) (McDonald-McGinn et al., 1999); altersabhängige Folgen sind z.B. Fütterstörungen mit schlechtem Saugreflex und Näseln
- * Hypokalzämie bzw. Hypoparathyreoidismus
- * Immunschwäche (in ca. 75% bei 22q11.2DS); betroffen ist die T-Zell-vermittelte (häufige Thymushypo- oder -aplasie) und die humorale Abwehr (Sullivan et al., 1998)
- * charakteristische, jedoch nicht abnorme Fazies (Shprintzen, 2008): „langes Gesicht; enge Lidspalten; kleine Augen mit geschwollenen Augenlidern; prominenter Nasenrücken mit breiter, teils zwiebel förmiger Nasenspitze und hypoplastischen Nasenflügeln; langes Philtrum; kleiner, fischartiger Mund; Mandibulahypoplasie; kleine Ohren mit auffälliger Helix (Shprintzen et al., 1978)“ (Briegel/Cohen, 2004)



Abb. 3 Typische Fazies einer jungen Patientin mit 22q11.2DS (aus Shprintzen RJ. *Velo-cardio-facial syndrome: a distinctive behavioral phenotype. Mental Retardation in Developmental Disabilities Research Reviews* (2000) 6, 142-147; Abdruck mit Genehmigung von Wiley-Liss, Inc., Subsidiary of John Wiley & Sons, Inc.)

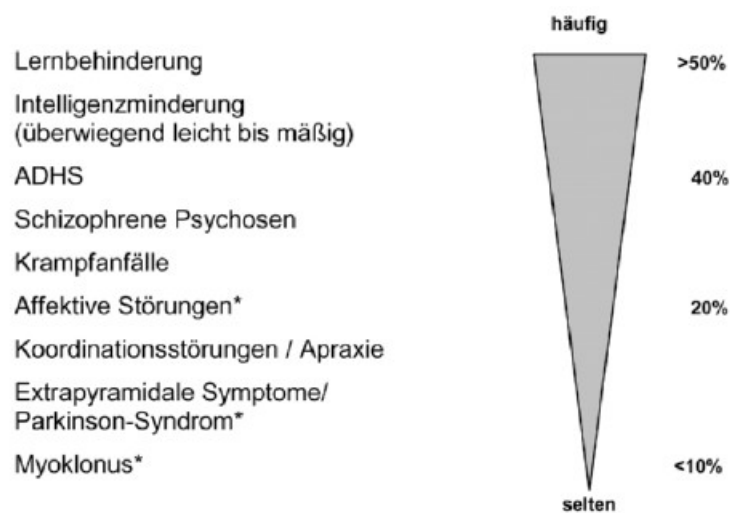
1. Einleitung

Neben den somatischen Auffälligkeiten gibt es beim 22q11.2DS auch kognitive, Verhaltens- und v.a. psychiatrische – allen voran schizophrene – Auffälligkeiten, denen das nächste Kapitel gewidmet ist:

1.7.3.2. Der psychiatrische Phänotyp beim 22q11.2DS

Bisweilen wird die Diagnose eines 22q11.2DS – v.a. bei Fehlen offensichtlicher somatischer Auffälligkeiten – erst durch kognitive oder psychiatrische Auffälligkeiten sowie neurologische Erkrankungen gestellt (Sieberer et al., 2006; Kook et al., 2010).

„Bei mehr als der Hälfte der Patienten mit einem VCFS bestehen Symptome und Erkrankungen aus dem neuropsychiatrischen Spektrum.“ (Sieberer et al., 2006) Abb. 4 zeigt diese neuropsychiatrischen Merkmale:



* Bisher keine eindeutige Studienlage zu Häufigkeit und Stellenwert dieser Symptome bei 22q11.2 Mikrodeletionen

Abb. 4 Häufige neuropsychiatrische Symptome bei 22q11DS (aus Sieberer et al., 2006)

Ein gehäuftes Auftreten psychiatrischer Symptome bei Patienten mit 22q11.2DS wurde erstmals 1992 beschrieben (Sieberer et al., 2006). Damals beobachteten Shprintzen et al. in einem Kollektiv von 90 Patienten mit 22q11.2DS bei mehr als 10% der Patienten psychische Erkrankungen, vor allem schizophrene Psychosen (Sieberer et al., 2006; Shprintzen et al., 1992). Auch andere, in der Folge durchgeführte Studien bestätigten die auffallend erhöhte Rate an Schizophrenieerkrankungen unter 22q11.2DS-Patienten (z.B. Pulver et al., 1994; Murphy et al., 1999; siehe Abb. 51 im Anhang), und das Risiko eines 22q11.2DS-Patienten an Schizophrenie zu erkranken, soll 30% betragen (Arinami, 2006). „Nach Murphy ist die Del.22q11.2 somit einer der wichtigsten bisher bekannten Risikofaktoren für die Entwicklung einer Schizophrenie. Nur eineiige Zwillinge, deren genetisch identisches Geschwister an einer Schizophrenie leidet, und Kinder von Eltern, die beide an einer Schizophrenie erkrankt sind, sollen ein höheres Erkrankungsrisiko haben (Murphy, 2002).“ (Briegel/Cohen, 2004) Dabei ist der 22q11DS-Subtyp der Schizophrenie „nach derzeitigem Kenntnisstand mit Schizophrenien anderer Ätiologie phänotypisch weitgehend identisch und damit klinisch nicht sicher unterscheidbar.“ (Sieberer et al., 2006) „Als mögliche Unterscheidungsmerkmale gelten die charakteristischen physischen Symptome oder gleichzeitig bestehende kognitive Einschränkungen [Bassett et al., 2003].“ (Sieberer et al., 2006) Was die Kognition betrifft, so kann bei

1. Einleitung

Del.22q11.2-Mutationsträgern im Schulalter meist eine leichte mentale Retardierung bis ein IQ im unteren Durchschnitt gefunden werden (Antshel et al., 2008) (mittlerer IQ von ca. 74 (Swillen et al., 1997; Woodin et al., 2001; Feinstein et al., 2002; Antshel et al., 2005; Oskarsdottir et al., 2005; Campbell et al., 2006; Shashi et al., 2006)). Lernbehinderungen bestehen v.a. in den Bereichen Mathematik, Leseverständnis, visuell-räumliche Fähigkeiten, Aufmerksamkeit und Exekutivfunktionen (Antshel et al., 2008).

In der Literatur können widersprüchliche Angaben gefunden werden, wenn es um die Prävalenz von Juvenilen Schizophrenien bei 22q11.2DS auf der einen Seite und der Prävalenz eines 22q11.2DS bei juvenil an Schizophrenie erkrankten Patienten auf der anderen Seite geht:

Bei Kindern und Jugendlichen mit 22q11.2DS können zwar bisweilen psychotische Symptome gefunden werden (Feinstein et al., 2002; Gothelf et al., 2007; Baker/Skuse, 2005; Debbane et al., 2006) – auch psychiatrische Krankheiten, v.a. ein Aufmerksamkeitsdefizit-/ Hyperaktivitätssyndrom (ADHS), kommen häufig vor (z.B. Niklasson et al., 2001; Niklasson et al., 2002) –, schizophrene Erkrankungen werden jedoch gewöhnlich nicht in diesem Alter beobachtet (Papolos et al., 1996; Niklasson et al., 2001; Niklasson et al., 2002).

Ganz anders verhält es sich, wenn man im Kollektiv der jung erkrankten Schizophreniepatienten („early-onset“ = juveniles Erkrankungsalter, d.h. Erkrankungsalter < 18 Jahren (Ivanov et al., 2003); „very-early-onset“ = „childhood-onset“, d.h. Erkrankungsalter < 12 Jahren (Usiskin et al., 1999; Yan et al., 1998)) nach Mikrodeletion 22q11.2-Trägern sucht, was wichtig für die Schizophrenieforschung und ihre Ätiopathogeneseforschung ist. Hier wird von manchen Autoren eine, im Vergleich zur Normalbevölkerung und im Vergleich zu adulten Schizophreniepatienten, deutlich erhöhte Prävalenz postuliert (Usiskin et al., 1999; Sporn et al., 2004; Yan et al., 1998). Die Prävalenz einer Deletion 22q11.2 wird hier mit bis zu 6.4% angegeben (Usiskin et al., 1999). Genaueres hierzu siehe Kapitel 5.4.3. im Diskussionsteil.

Für adulte Schizophreniepatienten können je nach Studiendesign und den angewandten Selektionskriterien zur Diagnostik Prävalenzraten einer Mikrodeletion 22q11.2 von 0.6 – 53% angegeben werden (Sieberer et al., 2006; Murphy, 2002). Bassett und Chow stellten in ihrem Review Prävalenzberechnungen anhand von 2342 Schizophreniepatienten aus insgesamt acht Studien an und kamen auf eine Prävalenz der Mikrodeletion von 1% (Jolin et al., 2009; Bassett/Chow, 2008). Diese Prävalenzrate übertrifft die 22q11.2-Prävalenz von ca. 0.025% der Normalbevölkerung um das 40-fache.

Abb. 51 im Anhang gibt einen Überblick der Studien zur Prävalenzbestimmung der Mikrodeletion 22q11.2 bei Schizophreniepatienten.

Wurde vorhin gesagt, dass schizophrene Erkrankungen gewöhnlich nicht bei Kindern und Jugendlichen mit 22q11.2DS gefunden werden können, so können bei diesen Kindern/Jugendlichen jedoch einige typische Verhaltensweisen beobachtet werden (z.B. Prasad et al., 2008). Baker und Skuse berichteten in ihrer 2005 durchgeführten Studie, „dass Heranwachsende mit 22q11.2DS neben unangemessener Emotionalität und Störungen im Sozialverhalten zu hohem Prozentsatz auch schizotype Symptome aufwiesen und nahezu 50% der untersuchten Patienten über vorübergehende psychotische Erlebnisweisen berichten [Baker/Skuse, 2005]. Die Autoren deuten diese psychopathologischen Merkmale der Heranwachsenden als Hinweis auf ein Kontinuum von Entwicklungsstörungen bei 22q11.2DS, das mit abnehmender psychischer Gesundheit im frühen Erwachsenenalter assoziiert ist. Es könnte sich daher bei den genannten Verhaltensmerkmalen auch um Frühzeichen einer psychischen Erkrankung, insbesondere einer (schizophrenen) Psychose handeln.“ (Sieberer et al., 2006) Longitudinale Studien sind ausstehend.

1. Einleitung

Laut Baker und Vorstman könnte hinter den verschiedenen psychiatrischen Präsentationen des 22q11DS ein psychiatrischer Kern-Phänotyp stecken mit Aufmerksamkeits- und exekutiven Defiziten, sozialen und kognitiven Defiziten, ängstlich-affektiver Dysregulation und psychotischen Phänomenen (Baker/Vorstman, 2012). Diese Kategorien hielten sich, so die Autoren, nicht an die Einteilung der traditionellen Diagnosesysteme und könnten übereinstimmend bei Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen mit 22q11.2DS gefunden werden (Baker/Vorstman, 2012).

Die Mikrodeletion 22q11.2 ist als „genetischer Subtyp der Schizophrenie“ (Bassett/Chow, 1999) besonders interessant, und man vermutet das Vorhandensein eines oder mehrerer Gene im Deletionsbereich, die auch in der „Nicht-22q11.2DS-Allgemeinbevölkerung“ die Anfälligkeit für die Entwicklung einer Schizophrenie vermitteln könnten (siehe hierzu auch das nächste Kapitel).

1.7.3.3. Kandidatengene für Schizophrenie im Deletionsbereich

Es wird vermutet, dass nicht ein einzelnes Gen im Deletionsbereich den klinischen Phänotyp des Mikrodeletion 22q11DS bedingt, sondern dass es sich vielmehr um ein sogenanntes „contiguous gene syndrome“ handelt, d.h. mehrere Gene wirken zusammen und verursachen so das Syndrom (Karayiorgou/Gogos, 2004). Ein oder mehrere verantwortliche Gene könnten Dosis-sensitiv sein (Verlust einer „Gendosis“ durch die Mikrodeletion), es könnte durch die hemizygote Deletion zu einer „Demaskierung“ rezessiver Allele oder Polymorphismen auf dem intakten anderen Chromosom 22 kommen, oder es könnten sich im Deletionsbereich auch Steuersequenzen befinden, die Gene regulieren, die weiter weg von der Deletion auf dem Chromosom 22 oder sogar auf einem ganz anderen Chromosom liegen (Williams, 2011); auch das sogenannte „Imprinting“ (Herkunft des betroffenen Chromosoms von Mutter oder Vater mit einem unterschiedlichen Genexpressionsmuster) könnte eine Rolle für das Krankheitsbild spielen (Maynard et al., 2002).

Im 1.5 Mb-großen Deletionsbereich, der als der Krankheits-kritische Bereich gilt, befinden sich 28 Gene (Drew et al., 2011).

In der Literatur daraus viel-zitierte Kandidatengene für Schizophrenie sind:

- * COMT (Catechol-o-Methyltransferase): die Catechol-o-Methyltransferase ist v.a. im präfrontalen Kortex für den Abbau von Dopamin zuständig; bekannt ist in erster Linie der Val158Met-Polymorphismus der membrangebundenen/im Gehirn vorkommenden Form, die Studienergebnisse des Polymorphismus im Zusammenhang mit der Schizophrenie sind jedoch uneinheitlich und widersprüchlich
- * PRODH (Proline Dehydrogenase (Oxidase) 1): das mitochondriale Enzym katalysiert den ersten Schritt des Abbaus von L-Prolin, einem vermutlichen Neuromodulator; Defekte in diesem Gen verursachen die Hyperprolinämie Typ 1
- * ZDHHC8 (Zinc Finger, DHHC-type Containing 8): dieses Gen kodiert für eine mutmaßliche Palmitoyl-Transferase, wobei die Palmitoylierung eine post-translationale Modifikation ist und viele neuronale Proteine einschließlich viele Neurotransmitter reversibel modifiziert
- * CLDN5 (Claudin 5): ein größeres Zelladhäsionsmolekül der tight junctions von Endothelzellen im Gehirn
- * DGCR14 (diGeorge Syndrome Critical Region Gene 14): das Protein könnte Bestandteil der Spliceosomen sein
- * DGCR2 (kiaa163 Gene Product): kodiert ein vermeintliches neues Zelladhäsionsrezeptorprotein

1. Einleitung

- * GNBIL (Guanine Nucleotide Binding Protein (G-Protein), β Polypeptide 1-like): kodiert ein Polypeptid, welches der β -Untereinheit von G-Proteinen ähnelt
 - * Tbx1 (t-box 1): das Protein ist Mitglied einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die eine DNA-Bindungsregion gemeinsam haben, die sogenannte T-box; *Tbx1* ist verantwortlich für viele körperliche Symptome des 22q11.2DS
 - * ARVCF (Armadillo Repeat Gene Deletes in Velocardiofacial Syndrome): ein Mitglied der Catenin-Familie
 - * UFDIL (Ubiquitin Fusion Degradation 1-like (*S. cerevisiae*)): Protein, das für den Abbau ubiquitinerter Proteine zuständig ist
 - * GSCL (Goosecoid-like): ein Homeodomäne-beinhaltendes Gen, welches in wenigen Geweben des Erwachsenen sowie in der frühen Entwicklung aktiv ist
- (nach Drew et al., 2011 und Arinami, 2006)

1.7.3.4. Fragestellung zur Mikrodeletion 22q11.2

Wie in Kapitel 1.7.3.2. beschrieben, ist mit der Mikrodeletion 22q11.2 ein großes Risiko für die Entwicklung einer Schizophrenie bei betroffenen Patienten verbunden, und sie gilt deshalb als „genetischer Subtyp der Schizophrenie“ (Bassett/Chow, 1999). Bei anderen neurologischen Erkrankungen, wie beispielsweise M. Parkinson, hat sich gezeigt, dass genetische Risikofaktoren mit hoher Penetranz die Wahrscheinlichkeit für einen ungewöhnlich frühen Krankheitsbeginn erhöhen. Theoretisch wäre ein solcher Effekt auch bei der Mikrodeletion 22q11.2 denkbar.

In der vorliegenden Arbeit geht es deshalb um die Bestimmung der Prävalenz, die die Mikrodeletion 22q11.2 bei juvenil an Schizophrenie erkrankten und nicht vor-selektionierten Patienten hat.

Für schizophrene Patienten mit einem Beginn der Erkrankung im Kindes- oder Jugendalter gibt es, im Gegensatz zu Studien an adulten Schizophreniepatienten, bisher nur eine begrenzte Zahl von Studien, die meist geringe Fallzahlen aufweisen und z.T. widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Mikrodeletion 22q11.2 zeigen (von keine erhöhte Prävalenz bis um mehr als das 250-Fache erhöhte Prävalenz (Ivanov et al., 2003; Usiskin et al., 1999)). Hier soll v.a. die Hypothese getestet werden, ob bei juvenilen Schizophreniepatienten tatsächlich eine höhere Prävalenz der Mikrodeletion 22q11.2 als in der Normalbevölkerung und v.a. auch eine höhere Prävalenz als bei erst im Erwachsenenalter erkrankten Patienten gefunden werden kann.

1.7.4. Risikofaktor ADNFLE-Mutation *CHRNA4-776ins3*?

Neben der Mikrodeletion 22q11.2 liegt ein Haupt-Augenmerk dieser Dissertation auf der ADNFLE, einer monogenen Epilepsie, bei welcher eine der ursächlichen Mutationen, *CHRNA4-776ins3*, aufgrund der im Folgenden beschriebenen Beobachtungen einen potenziellen Risikofaktor für die Entstehung einer Schizophrenie darstellt (Magnusson et al., 2003).

1.7.4.1. Das Krankheitsbild ADNFLE

Die ADNFLE = autosomal-dominante nächtliche Frontallappenepilepsie ist eine familiäre fokale Epilepsieform, die gekennzeichnet ist durch Cluster von nächtlichen motorischen Anfällen, welche oft stereotyp verlaufen und kurz sind (Hirose/Kurahashi, 2010; Oldani et al., 1996; Thomas et al., 1998; Nakken et al., 1999; Provini et al., 1999; Ito et al., 2000; Picard et al., 2000). Sie variieren

1. Einleitung

von einfachen Erweckungen aus dem Schlaf bis hin zu dramatischen, oft bizarren, hyperkinetischen Ereignissen mit tonischen oder dystonen Merkmalen (Hirose/Kurahashi, 2010). Während der Anfälle bleibt das Bewusstsein üblicherweise erhalten, selten kommt es zu Anfällen tagsüber (Hirose/Kurahashi, 2010).

Die Krankheit beginnt in 80% der Fälle in der ersten oder zweiten Lebensdekade (Oldani et al., 1998; Picard et al., 2000) (mittleres Erkrankungsalter zehn Jahre) und besteht ein Leben lang ohne jedoch progressiv zu sein, im Gegenteil werden die Anfälle mit dem Alter eher milder und seltener (Hirose/Kurahashi, 2010).

Die Penetranz der autosomal-dominant vererbten Erkrankung liegt bei ca. 70%, und bei ca. 10 – 20% der ADNFLE-Betroffenen kann eine Mutation im *CHRNA4*-, *CHRNA2*- oder *CHRNA2*-Gen gefunden werden (Hirose/Kurahashi, 2010) (siehe hierzu Kapitel 1.5.4.2.).

Die Diagnose der ADNFLE erfolgt klinisch bzw. anamnestisch und wird ggf. durch ein Video-EEG-Monitoring unterstützt (Hirose/Kurahashi, 2010). Viele der Patienten weisen keine neurologischen Defizite auf, allerdings ist für einige Mutationen ein erhöhtes Risiko für kognitive Defizite bekannt. Die zerebrale Bildgebung ist meist unauffällig, und das Anfalls-EEG kann normal oder durch Muskelartefakte verschleiert sein (Hirose/Kurahashi, 2010). Die ADNFLE wird – u.a. nicht zuletzt aufgrund einer z.T. großen inter- und intrafamiliären und altersabhängig sogar intra-individuellen Variabilität (Andermann et al., 2005; Combi et al., 2004; Hirose/Kurahashi, 2010) – oft nicht oder nur verspätet erkannt. Typische Differenzialdiagnosen sind z.B.: Parasomnien (Pavor nocturnus und Somnambulismus), FPEVF (= familial partial epilepsy with variable foci), Restless legs-Syndrom oder obstruktive Schlafapnoe (Hirose/Kurahashi, 2010).

Therapie der Wahl bei der ADNFLE ist das Antiepileptikum Carbamazepin, auf das ca. 70% der ADNFLE-Patienten gut ansprechen (Hirose/Kurahashi, 2010).

1.7.4.2. Genetik der ADNFLE

Die ADNFLE war die erste Epilepsie beim Menschen, für die eine spezifische Mutation gefunden werden konnte (Steinlein et al., 1995; Rempel et al., 1998), und das *CHRNA4*-Gen war somit das erste Gen, von dem gezeigt werden konnte, dass es eine Epilepsie verursachen kann.

Die ADNFLE ist eine jener seltenen Epilepsien, die durch die Mutation eines einzelnen Gens, d.h. monogen, vererbt werden (Steinlein et al., 1995; Steinlein, 1999). Einzelne Mutationen zeigen eine stark reduzierte Penetranz (Leniger et al., 2003), so dass bei der ADNFLE offenbar ein fließender Übergang zum oligogenen Erbgang besteht. Die ADNFLE ist genetisch heterogen, was bedeutet, dass unterschiedliche Gendefekte zur gleichen Krankheit führen können (Steinlein et al., 1995; Phillips et al., 2001; Aridon et al., 2006).

Wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt, kann bei ca. 10 – 20% der ADNFLE-Betroffenen eine Mutation im *CHRNA4*-, *CHRNA2*- oder *CHRNA2*-Gen nachgewiesen werden. Diese Gene kodieren für verschiedene Untereinheiten des neuronalen nikotinischen Azetylcholinrezeptors (nAChR) (siehe auch Kapitel 1.7.4.3.). Eine Übersicht der verschiedenen nAChR-Mutationen bei der ADNFLE gibt Abb. 52 des Anhangs.

Neben den nAChR-Genen scheint es jedoch auch andere Gene zu geben, deren Veränderungen für die ADNFLE verantwortlich sein können; so konnte durch Bonati et al. bei vier unverwandten italienischen Familien eine Mutation an allen neun, im Gehirn vorkommenden nAChR-Untereinheiten weitgehend ausgeschlossen werden (Bonati et al., 2002). Combi et al. entdeckten durch eine genomweite Kopplungsanalyse bei einer italienischen ADNFLE-Familie zwei neue, für die

1. Einleitung

ADNFLE verdächtige Chromosomenabschnitte, und zwar 8q11.2-q21.1 und 3p22-24 (Combi et al., 2005b). Im Bezug auf ersteren Chromosomenabschnitt ist das *CRH*-Promotor-Gen (*CRH* = Corticotropin-releasing hormone) hoch-verdächtig, da bei ADNFLE-Probanden zwei neue Nucleotidvarianten in eben diesem Gen gefunden werden konnten, die mit der Krankheit in Zusammenhang stehen könnten (die Varianten g.-1470C>A und g.-1166G>C) (Combi et al., 2005a). Für den Chromosomenort 3p22-24 kommen v.a. die Gene *KCNH8* (Baxter et al., 2002), *SCN11A* (Jeong et al., 2000), *STAC* (Kawai et al., 1998) und *MOBP* (Yamamoto et al., 1994) als ADNFLE-Kandidatengene infrage (Combi et al., 2005b). Eindeutig pathogene Mutationen konnten allerdings bisher in diesen Genen nicht nachgewiesen werden. Erst kürzlich wurden zwei weitere Gene beschrieben, welche neben ADNFLE auch andere fokale Epilepsien verursachen können (*DEPDC5*) oder eine besonders schwere Form der ADNFLE (*KCNT1*) (Ishida et al., 2013; Heron et al., 2012).

Zusammengefasst liegt das Haupt-Augenmerk hinsichtlich der Genetik der ADNFLE auf den nAChR-Mutationen – und im Rahmen dieser Dissertation insbesondere auf der nAChR-Mutation *CHRNA4-776ins3* -, so dass es sich lohnt, zum besseren Verständnis und bevor genauer auf die *CHRNA4*-Mutation eingegangen wird, den nAChR kurz genauer zu betrachten:

1.7.4.3. Der neuronale nikotinische Azetylcholinrezeptor (nAChR)

Die nAChR sind sogenannte ligandengesteuerte Ionenkanäle (LGIC), von denen es die Rezeptoren an der neuromuskulären Endplatte der Skelettmuskelfaser und die sogenannten neuronalen Rezeptoren mit Vorkommen im gesamten peripheren und zentralen Nervensystem, aber auch peripheren Organen, gibt (Steinlein, 2007). Hier geht es um letztere Form der neuronalen Rezeptoren. Die nAChR werden durch endogene Liganden wie Azetylcholin (ACh) oder exogene Liganden wie Nikotin aktiviert (Steinlein, 2007).

Die neuronalen nAChR sind in die Zellmembran eingebettet (Itier/Bertrand, 2002; Raggenbass/Bertrand, 2002) und weisen eine pentamere Struktur auf (di Corcia et al., 2005; Steinlein/Bertrand, 2010), wobei jeweils fünf von insgesamt elf zur Verfügung stehenden Untereinheiten ($\alpha 2 - \alpha 7$, $\alpha 9 - \alpha 10$ und $\beta 2 - \beta 4$) (Gotti/Clementi, 2004; McGehee/Role, 1995; Sargent, 1993; Galzi/Changeux, 1995; Elgoyhen et al., 2001) in verschiedenen Kombinationen einen homo- oder heteromeren nAChR formen (di Corcia et al., 2005). Im Gehirn spielen die $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren die größte Rolle, die sich vermutlich zumeist aus zwei $\alpha 4$ - und drei $\beta 2$ -Untereinheiten zusammensetzen (Cooper et al., 1991). Die häufigsten α -Bungarotoxin-bindenden nAChR des Gehirns sind die homomer-pentameren $\alpha 7$ -Rezeptoren, die vermutlich u.a. an der Entwicklung des ZNS, der Regulation des Neuriten-Wachstums sowie der synaptischen Transmission beteiligt sind (Barrantes et al., 2000).

Jede Untereinheit des nAChR besteht aus einem extrazellulären, ligandenbindenden N-Terminus, vier Transmembrandomänen (TM1 – TM4), mehreren Schleifen, die die Transmembrandomänen miteinander verbinden und einem kleinen C-Terminus (siehe hierzu auch Abb. 5) (di Corcia et al., 2005). Die TM2, aber teilweise auch andere TMs, formen die Wände des Ionenkanals im Rezeptor und bestimmen somit seine Ionenselektivität (Raggenbass/Bertrand, 2002).

1. Einleitung

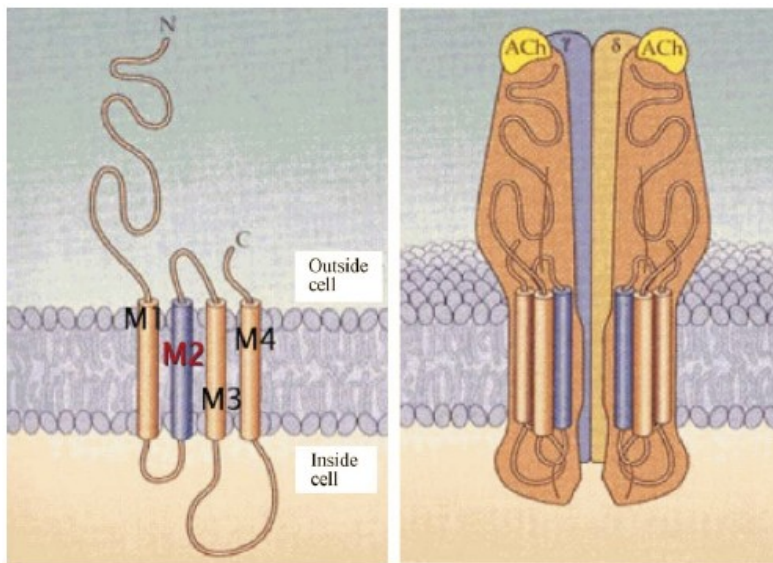


Abb. 5 Struktur des neuronalen nAChR in geöffnetem Zustand (aus di Corcia et al., 2005)

Die nAChR sind häufig präsynaptisch lokalisiert (de la Garza et al., 1987) und bewirken durch ihre Aktivierung mit Anstieg des intrazellulären Kalziums, eine erleichterte Neurotransmitterfreisetzung (di Corcia et al., 2005). Durch den Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration kann eine nAChR-Aktivierung zu ganz komplexen zellulären Antworten führen (Kalzium als „second messenger“) (Itier/Bertrand, 2002).

Die nAChR sind an vielen höheren Hirnleistungen beteiligt, so z.B. an der Aufmerksamkeit, dem Lernen/Gedächtnis, dem Schlaf/der Erweckung aus dem Schlaf, der Kontrolle der motorischen Aktivität und wahrscheinlich auch an der Gehirnentwicklung (Gotti et al., 1997; Cairns/Wonnacott, 1988; Court et al., 1995; Steinlein, 2007). In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass viele nAChR-Untereinheiten auch außerhalb des Gehirns exprimiert werden und dort u.a. eine Rolle bei der Tumorgenese haben können (Lau et al., 2013).

1.7.4.4. Die *CHRNA4-776ins3-Mutation*

Bei der *CHRNA4-776ins3-Mutation* handelt es sich im Gegensatz zu den anderen nAChR-Mutationen, welche Missense-Mutationen (Austausch einer Aminosäure gegen eine andere) sind (siehe Abb. 52 des Anhangs), um die Insertion eines zusätzlichen Basentriplets GCT an Nukleotidposition 776 in Exon 5 des *CHRNA4*-Gens. Diese Insertion bewirkt den Einbau einer zusätzlichen Aminosäure Leucin in TM2 (Steinlein et al., 1997) (zur TM2 siehe auch Kapitel 1.7.4.3.).

Die *CHRNA4-776ins3-Mutation* (aktuelle Bezeichnung *CHRNA4:865-873insGCT*) konnte bisher nur in einer einzigen ADNFLE-Familie nachgewiesen werden (siehe Abb. 52 des Anhangs), und zwar in einer norwegischen Familie mit dem in Abb. 6 gezeigten Stammbaum. In dieser Familie gibt es elf ADNFLE-Patienten (plus ein möglicherweise erkranktes Familienmitglied) (Steinlein et al., 1997) und mindestens zwei nicht erkrankte obligate Carrier der Mutation (Personen III1, III4, keine zuverlässige klinische Angabe zu II2/3) (Magnusson et al., 2003). Die -776ins3-Mutation konnte durch Steinlein et al. bei den Individuen III-1, III-3, IV-1, IV-2, IV-3, IV-5 und

1. Einleitung

IV-6 nachgewiesen werden, wobei nicht alle Familienmitglieder für die Testung zur Verfügung standen (Steinlein et al., 1997).

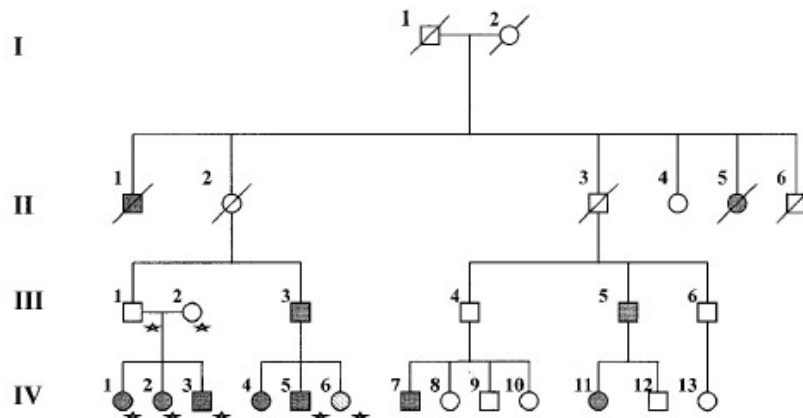


Abb. 6 Stammbaum der norwegischen ADNFLE-Familie mit der *CHRNA4-776ins3*-Mutation (aus Steinlein et al., 1997)

Diejenigen Familienmitglieder, die für eine molekulare Analyse zur Verfügung standen, sind mit einem Stern markiert, die ausgefüllten Symbole kennzeichnen Individuen, bei denen die Diagnose einer ADNFLE gestellt worden war (Person IV-6 ist möglicherweise betroffen); die in dieser Dissertation verwendete Mutationsprobe M (siehe Kapitel 2.4.) stammt von Person IV-5

An in vitro kultivierten *Xenopus*-/Krallenfrosch-Oozyten werden in sogenannten Rekonstitutions-experimenten die Eigenschaften veränderter nAChRs untersucht (z.B. Steinlein et al., 1997). Dabei führt die *CHRNA4-776ins3*-Mutation zu einer 10-fach gesteigerten Rezeptorsensitivität für ACh gegenüber dem Wildtyp -nAChR und zu einer verminderten Durchlässigkeit des nAChR für Kalziumionen (Steinlein et al., 1997). Ähnliche, aber in ihrem quantitativen Effekt nicht völlig identische Auswirkungen zeigten sich auch für andere ADNFLE-Mutationen. Durch die veränderten Rezeptoreigenschaften könnte es im Gehirn zu einem Ungleichgewicht zwischen Exzitation und Inhibition zu Gunsten von Ersterem kommen (Combi et al., 2004), so dass sich z.B. thalamokortikale Schlafspindeln über ihren normalen Herd hinaus ausbreiten und einen epileptischen Anfall auslösen können (Sutor/Zolles, 2001).

Im nächsten Kapitel ist beschrieben, warum gerade die *CHRNA4-776ins3*-Mutation für die vorliegende Dissertation und für das Thema Schizophrenie so interessant ist:

1.7.4.5. Schizophrenie-ähnliche Auffälligkeiten der *CHRNA4-776ins3*-Mutationsträger

Die ADNFLE galt ursprünglich als reine Epilepsie mit einem in erster Linie gutartigen Verlauf (Steinlein et al., 2012). In einer aktuell veröffentlichten Studie untersuchten Steinlein et al. die klinischen Merkmale von 19 ADNFLE-Familien aus 12 Ländern mit, in der Summe 150 Patienten (Steinlein et al., 2012). Das Ergebnis lässt vermuten, dass bestimmte nAChR-Mutationen mit einem erhöhten Risiko für neurologische und psychiatrische Symptome einhergehen könnten, wie mentale Retardierung, Schizophrenie-ähnliche Symptome oder schwere kognitive Defizite, wobei das Risiko bei den Trägern der jeweils anderen nAChR-Mutationen nicht erhöht zu sein scheint (Steinlein et al., 2012).

1. Einleitung

Wie aus der Abb. hervorgeht, fällt die „*CHRNA4*-776ins3-Familie“ durch eine Häufung ernster psychiatrischer Probleme mit v.a. Schizophrenie-ähnlichen Symptomen auf. Insgesamt ist die Anzahl psychiatrischer Patienten in dieser Familie vermutlich noch höher, jedoch weigerten sich drei der ADNFLE-Patienten aus dieser Familie, Auskunft über psychiatrische Probleme zu geben (Magnusson et al., 2003).

Magnusson et al. hatten 2003 die Häufigkeit psychiatrischer Erkrankungen bei den *CHRNA4*-Ser248Phe- und den *CHRNA4*-776ins3-Mutationsträgern verglichen. Beide Mutationen liegen eng benachbart in der TM2 von *CHRNA4* und verursachen einen vergleichbaren Epilepsie-Phänotyp. Es zeigte sich, dass mindestens vier Mitglieder der „*CHRNA4*-776ins3-Familie“ (diese vier Individuen sind auch Träger der 776ins3-Mutation, unter ihnen ein – möglicherweise zwei – Individuen ohne ADNFLE, siehe Abb. 6) bereits Kontakt mit psychiatrischen Dienstleistungen hatten: eine Person hatte eine Schizophrenie (IV-5, siehe Abb. 6 in Kapitel 1.7.4.4.), ein anderes Familienmitglied hatte mindestens zwei psychotische Episoden erlitten und nahm jahrelang antipsychotische Medikamente (IV-6), der vermutliche Mutations-Carrier II-2 wurde mindestens dreimal aufgrund psychiatrischer Probleme ins Krankenhaus eingewiesen, und ein viertes Familienmitglied benötigt wegen einer schweren einschränkenden Apathie (negative Symptomatik der Schizophrenie), Hilfe bei den Aktivitäten des täglichen Lebens (IV-2) (Magnusson et al., 2003). Weitere Personen aus dieser Familie, die an der Studie nicht teilnehmen wollten, waren in regelmäßiger psychiatrischer Behandlung (Magnusson et al., 2003). Es bestand eine vollständige Kosegregation zwischen psychiatrischen Auffälligkeiten und ADNFLE-Mutation. Eine solche Häufung psychiatrischer Probleme konnte bei der „Ser248Phe-Familie“ nicht gefunden werden (Magnusson et al., 2003).

1.7.4.6. Fragestellung der Arbeit hinsichtlich der ADNFLE

Magnusson et al. vermuten aufgrund ihrer in Kapitel 1.7.4.5. geschilderten Studie, die *CHRNA4*-776ins3-Mutation verursache nicht nur die ADNFLE, sondern könne auch ein Risikofaktor für die Entstehung einer Psychose oder Schizophrenie sein (Magnusson et al., 2003). Daher ist es interessant zu prüfen, ob – umgekehrt – unter schizophrenen Patienten *CHRNA4*-776ins3-Mutationsträger gefunden werden können, die somit helfen würden, der komplexen Ätiopathogenese der Schizophrenie ein Stückchen näher zu kommen. Auch Magnusson et al. betonen ihr Interesse an dieser Fragestellung (Magnusson et al., 2003). Da man bei juvenilen Schizophreniepatienten einen relativ größeren Einfluss der Gene auf die Krankheitsentstehung annimmt, sind diese für die Untersuchung sehr gut geeignet. Besonders spannend ist die Suche nach 776ins3-Mutationsträgern unter den psychotischen Patienten v.a. auch deshalb, weil, wie in Kapitel 1.7.4.1. beschrieben, die Diagnosestellung der ADNFLE oft sehr schwierig ist, und das Vorliegen der Krankheit z.T. gar nicht erkannt wird. Es stellt sich also die Frage, ob es unter den Schizophreniepatienten bisher unerkannte Fälle von ADNFLE – und der ADNFLE-Mutation *CHRNA4*-776ins3 – gibt, und ob man durch die ADNFLE mehr über die Erkrankung Schizophrenie lernen kann.

1. Einleitung

1.8. Zusammenfassender Arbeitsauftrag der Dissertation

Um der komplexen Ätiopathogenese der Schizophrenie näher zu kommen, erfolgt bei den Probanden:

- 1.) eine konventionelle Chromosomenanalyse
- 2.) die Mikrodeletion 22q11.2-FISH-Analyse und
- 3.) die *CHRNA4*-776ins3-Genanalyse (Restriktionsenzymverdau).

2. Zellmaterial

2. Zellmaterial

2.1. Vorbedingungen

Die Studie der Promotionsarbeit wurde von der lokalen Ethikkommission geprüft und genehmigt (Projekt-Nummer: 294-05).

Die Betroffenen wurden über die Zielsetzung der Arbeit sowie über die anonyme Verwendung der erhobenen Daten und des gewonnenen Zellmaterials informiert. Jedem Probanden wurde eine anonyme Studiennummer zugewiesen. Die Studienteilnahme erfolgte auf freiwilliger Basis, und das schriftliche Einverständnis der Probanden – bei Minderjährigen auch das des/der Erziehungsberechtigten – musste vorliegen.

Die Studienteilnehmer der vorliegenden Arbeit mussten bei Krankheitsbeginn < 18 Jahre alt sein. (in Anlehnung an Breitkopf, 2008)

2.2. Zellkulturen aus der Psychiatrischen Klinik der LMU

Die meisten Patientenproben kamen aus der Psychiatrischen Klinik der LMU in der Nussbaumstraße.

Dort war 2003 eine große monozentrische Studie initiiert worden, um Risikogene und –loci für Schizophrenie zu identifizieren. Die Rekrutierung der Studienteilnehmer erfolgte über einen Zeitraum von mehreren Jahren mit mehr als 1000 Teilnehmern. Mit in die große Studie eingeschlossen wurden adulte UND juvenile Schizophreniepatienten aller Schizophrenie-Subtypen, z.T. die erkrankten oder auch gesunden Eltern/Geschwister der Schizophreniepatienten und Kontrollpersonen.

Diejenigen der Patienten, die zwischen 2003 und Anfang 2007 in die Studie aufgenommen wurden UND die in einem Alter von < 18 Jahren, d.h. juvenil an der Schizophrenie erkrankten (Beginn der Prodromalsymptome!), wurden in die Promotionsarbeit miteinbezogen (und in einem Fall der Bruder eines solchen Patienten (Kürzel „AB“)). Fünf Patienten mit einem Erkrankungsbeginn von 18 Jahren wurden ebenfalls miteinbezogen.

Die folgenden Ausführungen beziehen sich auch auf die „Gesamtstudie“ der Psychiatrischen Klinik:

Für einen Einschluss in die Studie mussten die Probanden zum Studienzeitpunkt mindestens 18 Jahre alt sein und kaukasischen Ursprungs sein. Die Diagnose der Schizophrenie musste bei den Patienten nach DSM-IV und/oder ICD-10 gestellt sein. Nicht in die Studie aufgenommen wurden Patienten mit einer schizoaffektiven Störung oder einer affektiven Störung ohne Bezug zur Schizophrenie. Es durfte kein monozygoter Zwilling bereits an der Studie teilnehmen, und es durfte kein intravenöser Drogenmissbrauch mit einer Lebenszeitdiagnose von Abhängigkeit vorliegen. (Information von Herrn Prof. Dr. D. Rujescu, Psychiatrische Klinik der LMU).

Es wurden ambulante und stationäre Schizophreniepatienten in die Studie aufgenommen, die entweder in der Psychiatrischen Klinik der LMU selbst oder in anderen psychiatrischen Einrichtungen

2. Zellmaterial

(z.B. Bezirkskrankenhaus Haar) behandelt wurden, und die anhand ihrer Krankenakten ausgewählt und kontaktiert wurden. Einer Sichtung der Krankenunterlagen folgten:

1. ein Anamnesegespräch
2. ein SKID-I-Interview und
3. ein PANSS-Interview

Das Führen der Gespräche bzw. die Rekrutierung der Probanden war nicht Bestandteil der Dissertation; die Vorgehensweise wird hier jedoch beschrieben, um die Studienpopulation näher zu charakterisieren.

Anamnesegespräch:

Im Anamnesegespräch wurden z.B. Fragen zu folgenden Themen gestellt: schulischer und beruflicher Werdegang, familiäre/soziale Situation, Krankenhausaufenthalte in der Psychiatrie und ambulante psychiatrische Therapien, Medikamenteneinnahme, einschneidende Erlebnisse, Suizidversuche und aktuelle Lebenszufriedenheit. Auch die Themen Substanzmissbrauch (z.B. Drogenkonsum) und körperliche Erkrankungen wurden aufgegriffen: sowohl ein Substanzmissbrauch als auch verschiedene physische Krankheiten (so z.B. verschiedene neurologische oder endokrinologische Krankheiten, Stoffwechsel-/Autoimmun- oder Infektionserkrankungen) können alle erdenklichen Symptome einer Schizophrenie hervorrufen; gesucht waren jedoch im Rahmen der Studie nur die endogenen schizophrenen Psychosen, so dass Patienten mit den genannten Auslösefaktoren nicht mit in die Studie aufgenommen wurden.

(in Anlehnung an Gerngroß, 2009)

SKID-I-Interview:

Beim SKID-I handelt es sich um ein Strukturiertes klinisches Interview zur Diagnose psychischer Störungen der Achse I von DSM-IV.

Durch dieses Interview können z.B. Schizophrenien und andere psychotische Störungen, affektive Störungen, substanzinduzierte Störungen, Angst-/Anpassungs- und somatoforme Störungen, usw. beurteilt werden (Ausnahme: Persönlichkeitsstörungen, gehören zur Achse II und werden durch das SKID-II erfasst). Dadurch kann im vorliegenden Fall die Schizophreniediagnose der Patienten bestätigt werden, bzw. es können Komorbiditäten und Differenzialdiagnosen festgestellt werden. Wie weiter oben in diesem Kapitel bereits beschrieben, wurden Patienten mit einer schizoaffektiven Störung, affektiven Störung mit psychotischen Merkmalen, mit einer schizophreniformen Störung oder mit einer nur kurzen oder nicht näher zu bezeichnenden psychotischen und rein wahnhaften Störung, von der Studienteilnahme ausgeschlossen. Bei Vorliegen einer Schizophrenie kann diese durch das SKID-I einem Schizophrenie-Subtypen (siehe Kapitel 1.4.) zugeordnet werden, und es kann der Schweregrad und Verlauf der Erkrankung beurteilt werden.

Im SKID-I erfolgt zunächst eine Art Screening, bevor der Interviewer dann an den auffälligen Stellen weiter in die Tiefe geht; so ist der Zeitaufwand geringer, und der Untersucher kann gezielter auf jeden Patienten eingehen.

(in Anlehnung an Gerngroß, 2009; Wittchen et al., 1997; <http://www.doccheck.de>; <http://www.psychology48.com>)

PANSS-Interview:

Neben dem Anamnesegespräch und dem SKID-I kam die PANSS (= Positive and Negative Syndrome Scale) zur Anwendung, ein formalisiertes psychiatrisches Interview, in dem es darum geht, das quantitative Ausmaß verschiedener Symptome der Schizophrenie zu erfassen. Das PANSS-

2. Zellmaterial

Interview dauert ca. 30 – 40 Min., und es werden 30 Symptome anhand einer siebenstufigen Skala von 1 (nicht vorhanden) bis 7 (extrem ausgeprägt) bewertet. Die Symptome sind drei Skalen zugeordnet: der Positivskala, zu der z.B. Symptome wie Delusion, formale Denkstörung, Halluzinationen und Erregung gehören; der Negativskala, die beispielsweise die Symptome Affektverarmung, mangelnde Beziehungsfähigkeit und stereotypes Denken umfasst; und der psychopathologischen Globalskala, welche Angst, verlangsamte Motorik, Störung der Willensbildung, mangelnde Impulskontrolle, Selbstbezogenheit, leibliche Befindlichkeitsstörung und einige mehr enthält. Berichte über das alltägliche Verhalten und direkte Beobachtungen während des Interviews fließen in die Bewertung mit ein.

(in Anlehnung an Gerngroß, 2009; Kay et al., 1987)

Um nun wieder auf die **JUVENILE** Schizophreniegruppe als **Teil der „Gesamtstudie“** der Psychiatrischen Klinik zurückzukommen:

Es wurden 92 Proben der „Psychiatrie-Studie“ in der vorliegenden Dissertation untersucht, wobei es zwischen den anonymen 5000-er- und 3000-er-Studiennummern keine Unterschiede hinsichtlich der Studiendurchführung gab (interne Nummernvergabe der Psychiatrie).

Das durchschnittliche Erkrankungsalter der früh-betroffenen Patientengruppe lag bei 15,01 Jahren (von 7 Jahren bis 18 Jahren), es gab 19 weibliche und 73 männliche Probanden; zur Verteilung des Erkrankungszeitpunkts und des Geschlechts bei den Probanden aus der Psychiatrischen Klinik der LMU siehe Tabelle 6 in Kapitel 4.1..

Da die Proben über einen längeren Zeitraum gesammelt wurden und daher – im Gegensatz zu den Proben aus Kapitel 2.3. – nicht unmittelbar analysiert werden konnten, wurden sie von der Psychiatrischen Klinik als EBV-transformierte Lymphozytenkulturen zur Verfügung gestellt (siehe auch Kapitel 3.1.1.2.). Ebenfalls zur Verfügung gestellt wurden die fertig-vorbereiteten DNA-Proben der für die Dissertation infrage kommenden Studienteilnehmer.

2.3. Blutproben aus den BZK Landshut, Passau, Regensburg und dem Heckscher-Klinikum München

Einige Proben, die im Rahmen der Dissertation analysiert wurden, kamen aus den BZK Landshut, Passau und Regensburg sowie dem Heckscher-Klinikum in München.

Patienten, die für die Teilnahme am Kooperationsprojekt mit der Humangenetik der LMU infrage kamen, waren hier junge Patienten mit einer Psychose, d.h. neben Patienten mit einer schizophrenen Psychose auch solche mit einer affektiven – v.a. bipolaren –, schizoaffektiven oder einer akuten vorübergehenden psychotischen Störung (ICD-Diagnosen F32, F31, F25, F23).

In einem als Fragebogen strukturierten Erhebungsbogen wurden z.B. folgende Informationen über die Probanden eingeholt:

- * Hauptdiagnose mit Grad der Sicherheit, ggf. Differenzialdiagnose(n), ggf. weitere psychiatrische Diagnosen
- * Alter bei Ersterkrankung mit Grad der Sicherheit und wie festgelegt
- * bisheriger Krankheitsverlauf

2. Zellmaterial

- * prämorbidem Intelligenzniveau, Schulabschluss, berufliche Ausbildung
- * bestimmte körperliche Merkmale (siehe Abb. 3)
- * Familienanamnese

Abb. 53 im Anhang zeigt den verwendeten Erhebungsbogen.

Insgesamt kamen 17 Proben aus den genannten vier kinder- und jugendpsychiatrischen Kliniken, die in die vorliegende Promotionsarbeit miteinbezogen und analysiert wurden. Diese Proben wurden mit „A1“ bis „A18“ anonymisiert (kein Blutmaterial bei A7).

Das mittlere psychotische Erkrankungsalter lag in dieser Gruppe bei 14,71 Jahren (von 10 Jahren bis 17 Jahren). 8 Patienten waren weiblichen und 9 Patienten männlichen Geschlechts; zur Verteilung des Erkrankungsalters und des Geschlechts bei den Probanden aus den BZK Landshut, Passau, Regensburg und dem Heckscher-Klinikum München siehe Tabelle 6 in Kapitel 4.1..

Je ein Heparin-Röhrchen (für die Chromosomenanalyse und FISH) und ein EDTA-Blutröhrchen (für die Genanalyse) pro Studienteilnehmer wurde von den Kliniken in die Humangenetik geschickt.

Die Probanden aus den BZK Landshut, Passau, Regensburg und dem Heckscher-Klinikum München wurden erst während der bereits begonnenen Dissertation rekrutiert, so dass die in der Humangenetik eingehenden Blutproben innerhalb weniger Tage weiterverarbeitet werden konnten.

2.4. DNA-Probe eines bekannten *CHRNA4-776ins3*-Mutationsträgers

Die DNA-Probe eines bekannten *CHRNA4-776ins3*-Mutationsträgers diente als Positivkontrolle für die Genanalyse. Dieser Mutationsträger stammt aus der in Kapitel 1.7.4.4. beschriebenen norwegischen ADNFL-Familie.

2.5. DNA-Proben gesunder Medizinstudentinnen/-studenten

Einige wenige DNA-Proben gesunder Medizinstudentinnen und -studenten (bereits im Institut für Humangenetik vorhanden) wurden verwendet, um die optimalen Versuchsbedingungen für die Genanalyse herauszufinden (begrenzte Menge des DNA-Probenmaterials).

3. Methoden und methodenspezifisches Material

3. Methoden und methodenspezifisches Material

3.1. Chromosomenanalyse

3.1.1. Chromosomenpräparation...

Die Chromosomenpräparation bildet zusammen mit dem Auftropfen der entstehenden Zelllösung auf Objektträger (siehe Kapitel 3.1.2.) den Ausgangspunkt für die Chromosomenfärbung und -auswertung (siehe Kapitel 3.1.3. und 3.1.4.) sowie auch für die FISH (siehe Kapitel 3.2.).

3.1.1.1. ...aus Blutkultur

Im Falle der BZK Landshut, Passau, Regensburg und dem Heckscher-Klinikum München erfolgte die Chromosomenpräparation aus heparinisierten Vollblutproben.

in Anlehnung an die Arbeitsanweisung AA 5.5.1.1.1, Version 01, Chromosomenpräparation aus Blutkultur, Institut für Humangenetik des Klinikums der Universität München, erstellt durch PD Dr. rer. nat. Stefan Müller

Prinzip:

Die Blutzellen werden in einem geeigneten Nährmedium mithilfe von Phytohämagglutinin zur Teilung angeregt. Das Spindelfasergift Colcemid arretiert die sich teilenden Zellen in der (Pro-)metaphase der Mitose. Es folgt eine Hypotoniebehandlung mit Kaliumchlorid, die einen Wassereinstrom in die Zellen in Richtung des osmotischen Gradienten bewirkt; während die Lymphozyten dadurch lediglich anschwellen, platzen die anderen Zellen des Blutes. Durch Fixierung mit Methanol-Eisessig wird die Lösung von unbrauchbarem „Zellschrott“ befreit. Die gereinigte Zelllösung wird auf Objektträger aufgetropft (siehe Kapitel 3.1.2.), wobei die angeschwollenen Lymphozyten platzen und ihre Chromosomen freigeben.

Geräte, Materialien, Reagenzien:

Geräte:

Föhn, Leister
Sterilbank, UniEquip/BDK
Brutschrank, Heraeus
Zentrifuge, Heraeus, SEPATECH Megafuge 1.0
Pipettierhelfer accu-jet pro, Neolab

Materialien:

15 ml-Zellkulturröhrchen, Sarstedt
1 ml-Plastikspritzen, BD Plastipak
Transferpipetten Plastik 10 ml steril, Sarstedt
Pasteurpipetten Glas, Omnilab Schubert und Weiss
Gummi-Pipettierbälle, Neolab

3. Methoden und methodenspezifisches Material

Reagenzien:

fetales Kälberserum, Biochrom
 McCoy's-Medium, Gibco
 RPMI-Medium, Gibco
 Phytohämagglutinin L, Remel
 Phytohämagglutinin L, Biochrom
 Antibiotika (Penicillin 5.000 IE/Streptomycin 5.000 µg/ml), Sigma
 Colcemid KaryoMAX, Gibco
 Kaliumchlorid-Lösung 0.075 mol/l, Merck
 Methanol, Merck
 Essigsäure 100%, Merck

Durchführung:

Das Nährmedium wird in 15 ml-Zellkulturröhrchen aus folgenden Reagenzien angesetzt:

- * 2 ml fetales Kälberserum
- * 8 ml McCoy's- bzw. RPMI-Medium (Kultur „P“ bzw. Kultur „M“)
- * 0.1 ml Phytohämagglutinin von Remel
- * 0.1 ml Phytohämagglutinin von Biochrom
- * 3 Tropfen Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) aus der Spritzenkanüle

Pro Proband werden jeweils zwei Kulturen „M“ und eine Kultur „P“ vorbereitet. 9 – 10 Tropfen der heparinisierten Blutprobe werden mit einer kleinen Spritze in das jeweilige Nährmedium getropft. Luftblasen werden mit einem Föhn entfernt, und die noch in der Sterilbank stehenden Röhrchen werden verschlossen und durch mehrmaliges Auf- und Abkippen gemischt. Die Röhrchen werden im Röhrchenständer leicht schräg in den Brutschrank gestellt, wo sie bei 37 °C und ohne CO₂ für 65 – 72 Std. inkubiert werden. Nach der Inkubationszeit werden jeweils 0.1 ml Colcemid in die Röhrchen gespritzt und die Röhrchen dann im Brutschrank für weitere 16 Min. inkubiert. Anschließend werden die Röhrchen aus dem Brutschrank genommen und in der Zentrifuge für 10 Min. bei 1.000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der zelllose Überstand in den Röhrchen mittels Wasserstrahlpumpe bis knapp über dem Sediment abgesaugt und verworfen. Für die sich nun anschließende Hypotoniebehandlung wird jedes Zellpellet mit 37 °C-warmer Kaliumchlorid-Lösung (0.075 mol/l) auf 6 ml aufgefüllt, mit der Pasteurpipette resuspendiert und 7 – 16 Min. im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, wobei die Hypotoniezeit in Abhängigkeit von der Außentemperatur variiert. Es folgt dann ein erneutes Zentrifugieren und Absaugen mit der Wasserstrahlpumpe wie beschrieben. Ca. viermal wiederholen sich jetzt folgende Schritte: zum Zellpellet werden ungefähr 5 ml eines eisgekühlten Methanol-Eisessiggemisches (Verhältnis 3:1) zur Fixierung zugefügt, die Lösung wird sofort resuspendiert, dann zentrifugiert und der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe in bekannter Weise abgesaugt. Nach ca. vier Wiederholungen wandelt sich die Farbe der Zelllösung von rot über cola-farben und hellbraun nach klar. Nach dem erneuten Zugeben von Methanol-Eisessig wird das Röhrchen für mindestens 20 Min. bei 4 °C in den Kühlschrank gestellt. Anschließend wird das Röhrchen ein letztes Mal zentrifugiert und der Überstand diesmal bis auf 1 – 2 ml abgesaugt (es soll eine lockere Zelldichte erreicht werden). Mit der Pasteurpipette wird die Probe sorgfältig gemischt und dann auf Objektträger aufgetropft (siehe Kapitel 3.1.2.).

3. Methoden und methodenspezifisches Material

Einflussgrößen/Störfaktoren:

(aus der Arbeitsanweisung AA 5.5.1.1.1)

- * „Der Ansatz der Blutkultur sollte möglichst bald und nicht später als 5 Tage nach der Entnahme der Blutprobe erfolgen, da mit zunehmendem zeitlichem Abstand zur Probenentnahme die Anzahl lebender und damit stimulierbarer Zellen abnimmt.“ (gilt aufgrund der EBV-Transformation nicht! für Kapitel 3.1.1.2.)
- * „Die Dauer der Inkubation in Colcemid-Lösung beeinflusst erheblich den erzielten Mitoseindex, wie auch die Qualität der Chromosomenpräparation. Je länger die Inkubationszeit, desto höher ist der erzielte Mitoseindex. Gleichzeitig steigt jedoch auch der Anteil an Mitosen mit stark kondensierten Chromosomen, was wiederum zu einer geringen Auflösung des Bandenmusters führt.“
- * „Die Dauer der Inkubation in hypotoner KCl-Lösung bei 37 °C beeinflusst gleichfalls den erzielten Mitoseindex, wie auch die Qualität der Chromosomenpräparation. Wird die Inkubationsdauer zu kurz gewählt, verbleiben die Zellen nach dem Auftropfen auf den Objektträger im Zytoplasma. ... Wird die Inkubationsdauer zu lang gewählt, führt dies möglicherweise zum Platzen von Zellen in Suspension und damit zu einer Verringerung des Mitoseindex auf dem hergestellten Präparat. Weiterhin hat dies möglicherweise die Überspreitung der Chromosomen einzelner Mitosen auf dem Präparat zur Folge.“

3.1.1.2. ...aus Lymphozytenkultur

Bei den Proben aus der Psychiatrischen Klinik der LMU erfolgte die Chromosomenpräparation aus EBV-transformierten Lymphozytenkulturen.

Prinzip:

Die Proben wurden von Mitarbeitern der Psychiatrischen Klinik vorbereitet: die Lymphozyten wurden isoliert, mit dem EB-Virus zusammengebracht, kultiviert und bis zur Weiterverarbeitung bei -196 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das EB-Virus bewirkt, dass sich die Zellen auch nach längerer Zeit und nach dem Einfrieren wieder teilen.

Die weiteren Verarbeitungsschritte sind dann analog zu Kapitel 3.1.1.1.: Behandlung mit Colcemid, Kaliumchlorid und Methanol-Eisessig-Fixativ (Durchführung der Arbeitsschritte aufgrund des EB-Virus in den dafür zugelassenen Laborräumen der Psychiatrie).

Geräte, Materialien, Reagenzien:

Geräte:

Brutschrank, Binder Tuttlingen, CO₂-Inkubator Serie CB CB210

Brutschrank, Flow Laboratories, CO₂ Incubator 1500

Sterilbank, Uniequip Martinsried, Uniflow UVUB1200

accu-jet pro, Brand

Zentrifuge, Heraeus, Minifuge T

Materialien:

Plastik-Zellkulturfläschchen 25 cm² mit Filter-Schraubkappe, steril, TPP

1 ml-Plastikspritzen, BD Plastipak

Zentrifugenglasröhrchen 12 ml, Assistant

Pasteurpipetten lang Glas, Omnilab Schubert und Weiss

3. Methoden und methodenspezifisches Material

Gummi-Pipettierbälle, Neolab
Transferpipetten Plastik 10 ml steril, Sarstedt, Serological Pipette

Reagenzien:

Colcemid KaryoMAX, Gibco
Kaliumchlorid 0.4% auf 37 °C aufgewärmt, Merck
Methanol, Merck
Essigsäure 100%, Merck

Durchführung:

Zu ungefähr 30 ml Zellkultur im Plastik-Zellkulturfläschchen werden 0.3 ml Colcemid gegeben und für ca. 2 Std. im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Kultur in je 10 ml unterteilt (meist drei Zentrifugenglasröhrchen pro Probe) und in der Zentrifuge für 10 Min. bei 1.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand der Röhrchen wird nach der Zentrifugation abgekippt. Zum Zellpellet werden dann 5 ml 0.4%-iges Kaliumchlorid hinzugegeben, mit der Pasteurpipette resuspendiert und für ca. 20 – 30 Min. bei 37 °C inkubiert (ggf. experimentelles Variieren der Hypotoniezeiten bei den einzelnen Röhrchen einer Probe). Nach Beendigung der Hypotoniezeit werden zur Lösung im Glasröhrchen jeweils 3 ml eisgekühltes Methanol-Eisessig-Fixativ hinzugefügt, resuspendiert, unter den gleichen Parametern wie zuvor zentrifugiert und dann dekantiert. Noch zweimal werden 5 ml Fixativ hinzugegeben, die Lösung gemischt, zentrifugiert und dekantiert, bevor zur fast fertigen Zelllösung noch einmal ca. 1 – 2 ml Fixativ gegeben werden und die Zelllösung somit bis zum Auftropfen auf Objektträger (siehe Kapitel 3.1.2.) im Kühlschrank aufbewahrt werden kann; ein noch längeres Aufbewahren ist bei -20 °C in kleinen Tubes im Eisfach möglich.

Einflussgrößen/Störfaktoren:

Siehe Einflussgrößen/Störfaktoren Kapitel 3.1.1.1.

3.1.2. Auftropfen der Zelllösung auf Objektträger

in Anlehnung an die Arbeitsanweisung AA 5.5.1.1.1, Version 01, Chromosomenpräparation aus Blutkultur, Institut für Humangenetik des Klinikums der Universität München, erstellt durch PD Dr. rer. nat. Stefan Müller

Prinzip:

Siehe Prinzip Kapitel 3.1.1.1.

Geräte, Materialien, Reagenzien:

Geräte:

Ultraschall-Reinigungsbad Eltrosonic, Qualilab, Merck Eurolab GmbH
Heizplatte, Medax Nagel GmbH
Phasenkontrastmikroskop, Leitz

Materialien:

Objektträger Glas ca. 76 x 26 mm, Elka, Glaswarenfabrik Karl Hecht KG
Pasteurpipetten Glas, Omnilab Schubert und Weiss
Gummi-Pipettierbälle, Neolab

3. Methoden und methodenspezifisches Material

Reagenzien:

Deionisiertes Wasser, Klinikum der LMU

Durchführung:

Zuerst werden die Objektträger vorbereitet, indem diese 3 Min. lang im Ultraschallbad gereinigt und anschließend mit Leitungswasser und deionisiertem Wasser gespült werden. Die Aufbewahrung erfolgt im 4 °C-kalten Kühlschrank.

Die in Kapitel 3.1.1.1. und 3.1.1.2. entstandenen Zelllösungen werden mit der Pipette gemischt, und es werden – in Abhängigkeit von der Zelldichte der jeweiligen Probe – ca. 3 – 10 Tropfen auf einen gekühlten und nassen Objektträger getropft. Eine Qualitätskontrolle des hergestellten Präparats hinsichtlich von Mitosendichte und -qualität erfolgt mit dem Phasenkontrastmikroskop. Bevor die Präparate gefärbt werden, werden sie für 2 Tage auf der 50 °C-warmen Heizplatte „gealtert“.

Einflussgrößen/Störfaktoren:

Siehe Einflussgrößen/Störfaktoren Kapitel 3.1.1.1.

Durch das Variieren der Auftropfhöhe kann das Ausmaß der Chromosomenspreitung etwas beeinflusst werden. Durch Zugeben weniger Tropfen Essigsäure zur Zelllösung gelingt es eventuell, noch im Zytoplasma hängende Chromosomen etwas vom Zytoplasma zu lösen.

3.1.3. Verwendete Chromosomenfärbungen

3.1.3.1. GTG-Färbung

in Anlehnung an die Arbeitsanweisung AA 5.5.3.1, Version 01, GTG-Färbung, Institut für Human-genetik des Klinikums der Universität München, erstellt durch PD Dr. rer. nat. Stefan Müller

Beschreibung:

Die GTG-Färbung ist eine Standardmethode der Chromosomenbänderung. Es entsteht ein für jedes Chromosom typisches Bandenmuster mit hellen, d.h. Gen-reicheren/GC-reicheren und dunklen, d.h. Gen-ärmeren/AT-reicheren Banden, so dass numerische und strukturelle Chromosomenveränderungen erkannt werden können. Damit die Chromosomen die Giemsa-Farbe überhaupt aufnehmen, müssen sie mit dem Verdauungsenzym Trypsin vorbehandelt werden.

Geräte, Materialien, Reagenzien:

Geräte:

Pipettierhelfer accu-jet pro, Neolab
Hellfeldmikroskop, Leitz Orthoplan

Materialien:

Färbewanne Plastik
Glasküvetten eckig für 8 Objektträger, Fisher Scientific
Messzylinder 100 ml, Omnilab Schubert und Weiss
Zellstoffpapier einfach, Verschiedene
Faltenfilterpapier Durchmesser 150 mm, Schleicher und Schüll
Transferpipetten Plastik 10 ml steril, Sarstedt
1 ml-Plastikspritzen, BD Plastipak

3. Methoden und methodenspezifisches Material

Deckgläser 24 x 60 mm, Menzel

Reagenzien:

Ethanol 80%, Merck

Kaliumdihydrogenphosphat 1/15 mol, Merck

di-Natriumhydrogenphosphat 1/15 mol, Merck

Giemsa-Farbe, Sigma-Aldrich, Accustain

Aqua dest., Braun

Trypsin Stocklösung 2.5% in PBS, Biochrom

Hank'sche-Lösung, Hausapotheke des Klinikums der LMU

Vitro-Clud Einbettungsmedium, Langenbrinck

Durchführung:

In einer Färbewanne werden vier Glasküvetten mit folgendem Inhalt vorbereitet:

- Küvette 1: Ethanol 80%
- Küvette 2: 46 ml 1/15 mol Kaliumdihydrogenphosphat + 46 ml 1/15 mol di-Natriumhydrogenphosphat (= Sörensen-Puffer)
- Küvette 3: 92 ml Sörensen-Puffer + 8 ml gefilterte Giemsa-Farbe; der schillernde Belag an der Flüssigkeitsoberfläche wird mit Zellstoffpapier entfernt
- Küvette 4: Aqua dest.

Außerdem werden 0.03 – 0.1 ml Trypsin mit einer kleinen 1 ml-Spritze aufgezogen und mit Hank'scher Lösung zu 1 ml ergänzt (= Trypsin-Gebrauchslösung).

0.3 ml der aufgezogenen und gemischten Trypsin-Gebrauchslösung werden auf ein sauberes Deckglas gebracht, und das zu färbende Objektträgerpräparat wird mit der Oberseite nach unten aufgelegt und wird ca. 5 Sek. auf dem trypsinierten Deckglas belassen. Um die Wirkung des Trypsins wieder zu stoppen, wird das Präparat nach Abklopfen des Deckglases für 1 Min. in Küvette 1 gegeben. Die Pufferlösung in Küvette 2 säubert das Präparat vom Alkohol, und man schwenkt das Präparat wenige Male in dieser Lösung bis keine Alkohol-Schlieren mehr abgehen. In Küvette 3 wird das Präparat schließlich gefärbt, was ca. 3 – 7 Min. dauert. Nach Küvette 4 wird das nasse Präparat mit einem Deckglas bedeckt, und die Qualität der Färbung kann im Hellfeldmikroskop begutachtet werden. Das Deckglas wird wieder abgenommen, das Präparat wird schräg-gestellt und luftgetrocknet und steht nach Eindecken mit Vitro-Clud und Deckglas für die Chromosomenauswertung (siehe Kapitel 3.1.4.) zur Verfügung.

Einflussgrößen/Störfaktoren:

„Voraussetzung für den Erfolg der Methode ist - ... - eine optimale Chromosomenpräparation.“ (Arbeitsanweisung AA 5.5.3.1) (siehe Kapitel 3.1.1.)

Die Inkubationszeit in Giemsa-Färbelösung sowie die Dauer der Trypsinbehandlung und die Trypsinkonzentration müssen ggf. angepasst werden; so muss z.B. die Dauer der Trypsinbehandlung verringert werden, wenn die Chromosomen unter dem Hellfeldmikroskop „ausgefranst“ erscheinen.

3. Methoden und methodenspezifisches Material

3.1.3.2. Distamycin-DAPI-Färbung

in Anlehnung an die Standardarbeitsanweisung AA 5.5.3.7., Version 03 des Instituts für Humangenetik des Klinikums der Universität München, erstellt durch PD Dr. rer. nat. Stefan Müller

Beschreibung:

Bei der Distamycin-DAPI-Färbung handelt es sich um eine „spezifische Fluoreszenz-Färbung AT-reichen, perizentromerischen Heterochromatins der menschlichen Chromosomenbanden 1q12, 9q12, 15q11, 16q11.2 und Yq12.“ (Arbeitsanweisung AA 5.5.3.7) Die Färbung dient der „Absicherung der Diagnose des heterochromatischen Ursprungs chromosomaler Normvarianten nach GTG-Färbung, betreffend diese Chromosomenabschnitte. Diese Normvarianten können sowohl die Ausdehnung der heterochromatischen Region betreffen, als auch deren chromosomale Lokalisation.“ (Arbeitsanweisung AA 5.5.3.1)

Materialien, Reagenzien:

Materialien:

Deckgläser 20 x 60 mm, Menzel
Glasküvette für Objektträger, Fisher Scientific
Aufbewahrungsmappe für Objektträger

Reagenzien:

McIlvaine's Puffer (pH 7.0); 18 ml 0.1 M Zitronensäure (Sigma; 19.21 g/l Aqua dest.), 82 ml 0.2 M di-Natrium Hydrogenphosphat Na_2HPO_4 (Sigma; 35.60 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /l Aqua dest.)
Distamycin A Hydrochlorid-Färbelösung; 5 mg Distamycin A Hydrochlorid (Sigma) in 25 ml McIlvaine's Puffer lösen
Vectashield Antifade Einbettmedium mit DAPI, Vector laboratories

Durchführung:

Es werden 2 – 3 Tropfen Distamycin A Hydrochlorid-Färbelösung auf den Objektträger gebracht, ein Deckglas wird aufgelegt, und das Präparat wird 15 Min. im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird das Deckglas entfernt, und der Objektträger wird kurz in McIlvaine's Puffer gewaschen. Man legt ein neues Deckglas auf die Arbeitsfläche und bringt 1 – 2 Tropfen Vectashield Antifading-Lösung auf. Mit dem inzwischen getrockneten Objektträger berührt man nun das Deckglas (Testfeldseite nach unten), bis dieses sich am Objektträger festsaugt. Das Präparat wird umgedreht in eine Aufbewahrungsmappe gelegt und kann bis zur mikroskopischen Auswertung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert werden.

3.1.4. Chromosomenauswertung

Beschreibung/Durchführung:

Im Hellfeldmikroskop werden die hergestellten Objektträgerpräparate betrachtet; eine geeignete Mitosefigur – gute Spreitung/Länge/Färbung der Chromosomen – wird mit der Mikroskop-Kamera abfotografiert und kann dann mithilfe des Softwaretools „Ikaros“ analysiert und gespeichert werden. Maßgebend für die Chromosomenauswertung und Nomenklatur der Chromosomenbänderung war die ISCN 2005.

3. Methoden und methodenspezifisches Material

Geräte, Software, Literatur:

Geräte:

Hellfeldmikroskop, Leitz Orthoplan

Mikroskop-Kamera, Jenoptik Typ: ProgRes MF, Laser.Optik.Systeme GmbH Jena oder CCD-S/W-Videokamera AVT-BC 1, AVT-Horn Aalen

Software:

Ikaros, Karyotyping System V 5.2, Release 5.2.10, 1997 – 2008 by MetaSystems GmbH Altlussheim

Literatur:

Shaffer L. G., Tommerup N. (eds)

ISCN (2005), An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.

S. Karger, Basel (2005)

3.2. FISH

in Anlehnung an die Standardarbeitsanweisungen AA 5.5.4.1 und AA 5.5.4.4 des Instituts für Humangenetik des Klinikums der Universität München, erstellt durch PD Dr. rer. nat. Stefan Müller

Beschreibung:

„Die FISH beruht auf dem komplementären Aufbau der DNA-Doppelhelix. Gezielt hergestellte, mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte DNA-Sonden und die chromosomale DNA der Zellen des Patienten werden mittels Hitze einzelsträngig gemacht (...). Im Verlauf der nachfolgenden Rehybridisierung finden komplementäre DNA-Sequenzen zueinander, wodurch sich die (im Überschuss zugegebenen) markierten DNA-Sonden an die Patienten-DNA anlagern (...).“ (Schröck et al., 2008) Genaueres zu den hier verwendeten FISH-Sonden siehe Kapitel 4.3.1.. Die hybridisierten Präparate werden dann von überschüssigen Sonden-Molekülen gereinigt, und mittels DAPI-Färbung erfolgt die sozusagen „Hintergrundanfärbung“ der Chromosomen (zur DAPI-Färbung siehe auch Kapitel 3.1.3.2.). Die fertigen Präparate können dann im Fluoreszenzmikroskop mithilfe spezieller Filtersysteme betrachtet werden.

3.2.1. Hybridisierung in situ

Geräte, Materialien, Reagenzien:

Geräte:

Phasenkontrastmikroskop, Leitz

Heizbad, Lauda

Wärmebank, Medax

Hybridisierungsstation, Hybrite in situ, Abbott Molecular

Mikropipette 10 µl, Gilson Pipetman, Roth

Mikropipette 200 µl, Gilson Pipetman, Roth

Materialien:

Glasküvetten eckig für acht Objektträger, Fisher Scientific

Messzylinder 250 ml, Omnilab Schubert und Weiß

3. Methoden und methodenspezifisches Material

Papiertücher aus Zellstoff, Verschiedene
 Deckgläser 22 x 22 mm, Menzel
 Fixogum-Klebstoff, Marabu
 Mikropipettenspitzen, Art 10 reach 10 µl, MBP Fisher
 Mikropipettenspitzen 200 µl, Greiner Laborbedarf

Reagenzien:

20-fache SSC-Stammlösung (pH 5.3); 66 g SSC (Abbott Molecular) in 200 ml Aqua dest. lösen, unter Verwendung eines pH-Meters mit 1 N Salzsäure pH 5.3 einstellen, auf 250 ml Endvolumen mit Aqua dest. verdünnen
 HCl 1 N; 8,3 ml HCl rauchend (Merck) 100 ml Endvolumen mit deionisiertem Wasser verdünnen
 2-fache SSC-Lösung (pH 7.0); 100 ml 20x SSC, pH 5.3 auf 950 ml Endvolumen mit Aqua dest. verdünnen, unter Verwendung eines pH-Meters mit 1 N NaOH pH 7.0 einstellen, auf 1000 ml Endvolumen mit Aqua dest. verdünnen
 NaOH 1 N; 40 g Natriumhydroxid (NaOH) Plätzchen (Merck) in 1000 ml deionisiertem Wasser lösen
 Ethanol 100%, Merck
 Deionisiertes Wasser, Klinikum der LMU
 Sondenhybridisierungsmix, LSI/WCP^R Hybridization Buffer, Vysis/Abbott Molecular
 FISH-Sonde, LSI^R DiGeorge SpectrumOrangeTM/LSI ARSA SpectrumGreenTM DNA Probe, Vysis/Abbott Molecular

Durchführung:

Ausgangsmaterial für die FISH ist, wie bei der Chromosomenfärbung auch, das aufgetropfte und ungefärbte Objektträgerpräparat (siehe Kapitel 3.1.1. und 3.1.2.).

Im Phasenkontrastmikroskop wird mit dem Glasschneider vorsichtig ein Bereich des Objektträgerpräparates markiert, der für die FISH infrage kommt. Bei der Interphase-FISH werden anstelle der freien Mitosefiguren die Zellkerne (mit den darin enthaltenen Chromosomen) analysiert.

Wurde das Objektträgerpräparat vor weniger als 24 Std. aufgetropft, so wird es „gealtert“ bevor die In situ-Hybridisierung stattfindet; so gelingt es, die Struktur der Chromosomen bzw. der Zellkerne zu stabilisieren. Für das „Altern“ wird das Präparat 10 Min. lang in einer Küvette inkubiert, die 50 ml einer 2-fachen, 73 °C-warmen SSC-Lösung enthält. Je 1 Min. kommt das Präparat dann nacheinander in Küvetten einer aufsteigenden Alkoholreihe (80%-iger, 90%-iger, 100%-iger Ethanol) und wird somit entwässert. Das Präparat wird auf die 60 °C-warme Heizplatte gelegt bis der Alkohol verdampft ist.

Für die In situ-Hybridisierung werden 10 µl einer angesetzten Sondenlösung, bestehend aus 7 µl Sondenhybridisierungsmix, 2 µl deionisiertem Wasser und 1 µl Sonde, auf das zuvor markierte Areal des Objektträgerpräparates pipettiert. Es wird ein 22 x 22 mm-Deckglas aufgelegt, und man wartet bis sich die Sondenlösung bis an den Rand des Deckglases ausgebreitet hat; die Kanten des Deckglases werden dann großzügig mit Fixogum-Klebstoff verschlossen.

Die Hybridisierungsstation wird eingeschaltet, und das Präparat wird hineingelegt. Bei 72 °C erfolgt im Gerät für 5 Min. die Denaturierung der DNA, anschließend bei 37 °C die Hybridisierung über Nacht bzw. für max. 99.9 Std..

3. Methoden und methodenspezifisches Material

3.2.2. Abbruch der Hybridisierung

Geräte, Materialien, Reagenzien:

Geräte:

Heizbad, Lauda

Materialien:

Glasküvetten eckig für acht Objektträger, Fisher Scientific

Papiertücher aus Zellstoff, Verschiedene

Deckgläser 24 x 60 mm, Menzel

Aufbewahrungsmappe für Objektträgerpräparate

Reagenzien:

0.4-faches SSC/0.3%-iges Tween (pH 7.0); 20 ml 20x SSC Puffer, pH 5.3 (siehe voriges Kapitel) auf 950 ml Endvolumen mit Aqua dest. verdünnen, unter Verwendung eines pH-Meters mit 1 N NaOH pH 7.0 einstellen, auf 1000 ml Endvolumen mit Aqua dest. verdünnen, 3 ml Tween20 Detergenz (Merck) hinzupipettieren

NaOH 1 N; 40 g Natriumhydroxid (NaOH) Plätzchen (Merck) in 1000 ml deionisiertem Wasser lösen

2-faches SSC/0.1%-iges Tween (pH 7.0); 100 ml 20x SSC Puffer, pH 5.3 auf 950 ml Endvolumen mit Aqua dest. verdünnen, unter Verwendung eines pH-Meters mit 1 N NaOH pH 7.0 einstellen, auf 1000 ml Endvolumen mit Aqua dest. verdünnen, 1 ml Tween20 Detergenz (Merck) hinzupipettieren

DAPI-Lösung, Vectashield Antifade Einbettmedium mit DAPI, Vector laboratories H-1500, Axorra/Alexis

Durchführung:

Am nächsten Tag wird das Objektträgerpräparat aus der Hybridisierungsstation genommen, und auf der Unterseite des Präparates werden mit einem wasserfesten Stift die Umrisse des hybridisierten Feldes (Deckglasbereich) markiert bevor der Kleber und das Deckglas entfernt werden.

Das Präparat wird für 2 Min. bei 73 °C in einer Küvette mit 0.4-fachem SSC/0.3%-igem Tween inkubiert und anschließend für 1 Min. in einer Küvette mit 2-fachem SSC/0.1%-igem Tween bei Raumtemperatur gewaschen.

Der Objektträger wird dann hochkant an eine lichtgeschützte Stelle gestellt und luftgetrocknet. Ein 24 x 60 mm-großes Deckglas wird auf die Arbeitsfläche gelegt, und pro hybridisiertes Areal wird 1 Tropfen gekühlte DAPI-Lösung auf das Deckglas aufgebracht. Das Deckglas wird mit dem Objektträgerpräparat (Testfeldseite nach unten!) berührt bis sich das Deckglas festsaugt. Eventuell überschüssiges DAPI wird an den Rändern vorsichtig mit einem Papiertuch abgetupft.

Das fertige Präparat wird bis zur Analyse (siehe Kapitel 3.2.3.) bei 4 °C im Kühlschrank in einer Aufbewahrungsmappe im Dunkeln gelagert.

3.2.3. Analyse

Geräte, Software:

Geräte:

Epifluoreszenzmikroskop; ausgestattet mit DAPI, DEAC, FITC, TRITC, TexasRed und Cy5 Filter-

3. Methoden und methodenspezifisches Material

sat; Axioplan, Zeiss
Mikroskop-Kamera, Jenoptik Typ: ProgRes MF, Laser.Optik.Systeme GmbH Jena

Software:

Isis, FISH Imaging System V5.2, MetaSystems Altlußheim

Durchführung:

Die Analyse erfolgt am Epifluoreszenzmikroskop, ausgestattet mit DAPI, DEAC, FITC, TRITC, TexasRed und Cy5 Filtersatz. Als Computerprogramm kommt „Isis“ zur Anwendung.

3.3. Genanalyse

3.3.1. DNA-Extraktion aus EDTA-Vollblut

Kapitel 3.3.1. und 3.3.2. beziehen sich auf die Proben aus den BZK Landshut, Passau, Regensburg und dem Heckscher-Klinikum München.

Die DNA-Extraktion bei den „Psychiatrie-Proben“ erfolgte durch Mitarbeiter der Psychiatrischen Klinik, und die fertigen DNA-Proben wurden in der gewünschten Konzentration von 20 ng/µl für die Dissertation zur Verfügung gestellt.

Beschreibung:

Die DNA-Extraktion erfolgt hier mithilfe der Salzfällung nach Miller et al., 1998. Bei dieser Methode werden die kernlosen, nicht verwendbaren Erythrozyten lysiert, und die gesuchte Leukozyten-DNA wird von Zellproteinen und anderen Leukozyten-Kernbestandteilen gereinigt. Durch Ethanol erfolgt die DNA-Fällung und –Reinigung.

Geräte, Materialien, Reagenzien:

Geräte:

Zentrifuge, Allegra 25R Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, USA
Vortexer, Genie 2 TM, Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Inkubator, Heraeus, Hanau
Verschiedene Mikropipetten, Pipetman, Gilson, Villiersle-Bel, F

Materialien:

Falcon-Röhrchen 50 ml, Cellstar^R Tubes, Greiner Bio-One Solingen
Papiertücher aus Zellstoff, Verschiedene
Eppendorf-Tubes 1.5 ml, Sarstedt Nümbrecht
Pipettenspitzen, Sarstedt Nümbrecht (200 µl, gelb und 1000 µl, blau) und Biozym Scientific GmbH Hess. Oldendorf/Biozym Biotech Trading GmbH Wien (10 µl, farblos)

Reagenzien:

Erythrozytenlysepuffer 1000 ml (autoklaviert); bestehend aus: 155 mM (8.29 g) NH₄Cl, 10 mM (1.00 g) KHCO₃, 0.1 mM (0.5 ml/0.2 M) EDTA; Merck Darmstadt
SE-Puffer 100 ml (pH 8.0, autoklaviert); bestehend aus: 75 mM (4.39 g) NaCl, 25 mM (12.5 ml/0.2 M) Na₂ EDTA; Merck Darmstadt
SDS-Lösung, Serva Heidelberg

3. Methoden und methodenspezifisches Material

Proteinase, Sigma-Aldrich Deisenhofen
 5 M NaCl-Lösung, Merck Darmstadt
 Ethanol abs., Merck Darmstadt
 Ethanol 70%, Merck Darmstadt
 TE-Puffer 200 ml (pH 7.4, autoklaviert); bestehend aus: 10 mM (2 ml/1 M) Tris (Sigma-Aldrich Deisenhofen), 1 mM (1 ml/0.2 M) EDTA (Merck Darmstadt)

Durchführung:

Es werden 4 – max. 10 ml EDTA-Blut in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen gegeben, mit Erythrozytenlysepuffer aufgefüllt, gemischt und handgewärmt bis die Lösung klar wird. Das Röhrchen wird zentrifugiert (1200 rpm, 15 °C, 10 Min.), der Überstand wird dekantiert, und man lässt das Röhrchen umgedreht auf einem Papiertuch abtropfen. Es werden erneut 25 ml E-Lysepuffer zugegeben, und das Pellet wird durch kurzes Schütteln/Vortexen in Lösung gebracht. Die Lösung wird nochmals wie eben zentrifugiert, der Überstand wird wieder dekantiert und das umgedrehte Röhrchen zum Abtropfen auf ein Papiertuch gestellt.

Zum Pellet mit den kernhaltigen Zellen kommen nun 5 ml SE-Lösung, 250 µl SDS-Lösung und 20 µl Proteinase. Der Ansatz wird gemischt und über Nacht bei 37 °C drehend inkubiert.

Am nächsten Tag werden 2 ml 5 M-NaCl-Lösung zugefügt, und der „Zellabfall“ wird nach dem Vortexen und Zentrifugieren (3500 rpm, 15 °C, 10 Min.) als Pellet sichtbar. Der Überstand mit der darin enthaltenen DNA wird in ein neues 50 ml-Falcon-Röhrchen dekantiert und mit eisgekühltem Ethanol abs. auf 20 – 25 ml aufgefüllt. Das Röhrchen wird geschwenkt, die DNA sichtbar.

Mithilfe einer Pipettenspitze wird die DNA aus der Lösung gezogen und am Röhrchenrand abgestreift, so dass die Lösung abgekippt werden kann. Ca. 20 ml eisgekühlter 70%-iger Ethanol werden ins Röhrchen gegeben und die DNA darin resuspendiert und gewaschen. Die DNA wird in ein 1.5 ml-Tube überführt, etwas trocknen gelassen und dann je nach DNA-Menge mit 40 – 300 µl TE-Lösung gelöst. Man lässt das Tube für ca. 1 Std. bei Raumtemperatur stehen, bevor man es dann bei 4 °C im Kühlschrank lagert.

3.3.2. Herstellen einheitlicher Konzentrationen der DNA-Proben

Beschreibung:

Die gewählte, einheitliche DNA-Konzentration beträgt 20 ng/µl.

Die Ausgangskonzentrationen werden mithilfe des Photometers bestimmt, die gewünschte Konzentration durch Verdünnung mit H₂O hergestellt.

Geräte, Materialien, Reagenzien:

Geräte:

Photometer, Pharmacia GeneQuant RNA/DNA Calculator, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
 Mikropipetten, Pipetman, Gilson, Villiersle-Bel, F

Materialien:

Photometerküvette, Hellma Müllheim
 Eppendorf-Tubes 1.5 ml, Sarstedt Nümbrecht
 Pipettenspitzen, Sarstedt Nümbrecht (200 µl, gelb und 1000 µl, blau) und Biozym Scientific GmbH Hess. Oldendorf/Biozym Biotech Trading GmbH Wien (10 µl, farblos)

3. Methoden und methodenspezifisches Material

Reagenzien:

H₂O, Merck Darmstadt

Durchführung:

Anhand der Probe A1 soll das Vorgehen im Folgenden beispielhaft und stichpunktartig dargestellt werden:

- ** Referenzwert des Photometers: (398 µl) H₂O
- ** Inhalt der Photometerküvette (gut gemischt!): 398 µl H₂O, 2 µl DNA-Probe A1
- ** Messwert 1 von A1: 129.2 ng/µl, Messwert 2 von A1: 132.1 ng/µl, ➔ Mittelwert von A1: 130.65 ng/µl
- ** Ausgangs-/Ist-Konzentration von A1 = 130.65 ng/µl * 4 [Verdünnungsfaktor der Probe in H₂O: 1:200, im Gerät eingestellter Faktor: 1:50] = 522.6 ng/µl
- ** 522.6 ng/µl / 20 ng/µl [gewünschte Soll-Konzentration: 20 ng/µl] = 26.13,
- ➔ Verhältnis Ist- zu Soll-Konzentration für A1: 25:1,
- ➔ Herstellung der gewünschten Soll-Konzentration z.B. durch Mischen von 2 µl DNA-Probe A1 mit 50 µl H₂O

3.3.3. PCR

Beschreibung: (in Anlehnung an Hendrich, 2011)

Die PCR ist ein Verfahren, mit dem bestimmte gewünschte DNA-Abschnitte amplifiziert, d.h. vervielfältigt werden können. Zu diesem Zweck benötigt man zwei Primer, das sind zu wählende (siehe Kapitel 4.4.2.) und komplementär zur DNA passende Oligonukleotide, die den Start- und Endpunkt des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes definieren. Zunächst wird die Doppelstrang-DNA durch Hitze denaturiert, so dass DNA-Einzelstränge vorliegen und u.a. die gewählten Primer an die zu amplifizierende DNA binden können (= Annealing). Eine thermostabile DNA-Polymerase synthetisiert dann mithilfe zugegebener Nukleotide (dNTPs = Desoxynukleosidtriphosphate) anhand des jeweiligen Matrizenstranges den Komplementärstrang (= Elongation). Die Schritte Denaturierung – Annealing – Elongation wiederholen sich insgesamt 30 – 40 Mal, so dass eine exponentielle Vermehrung des gewählten DNA-Abschnittes stattfindet. Den Zyklen schließt sich eine 10-minütige Extension an.

In der vorliegenden Arbeit findet die sogenannte Touchdown-PCR Anwendung, bei der die Annealingtemperatur in den ersten sechs PCR-Zyklen jeweils um 1 °C erniedrigt wird. Die PCR erfolgt automatisiert im Thermocycler.

Geräte, Materialien, Reagenzien:

Geräte:

Vortexer, Genie 2 TM, Bender & Hobein AG, Zürich, CH
 Tischzentrifuge, Mini Microcentrifuge, Corning/LSETM
 Thermocycler, PTC 200 DNA Engine, MJ Research, Bio-Rad, München
 Mikropipetten, Pipetman, Gilson, Villiersle-Bel, F

Materialien:

Styroporbox mit Eis
 Eppendorf-Tubes 1.5 ml, Sarstedt Nümbrecht
 PCR-Tube-Reihen 0.2 ml, PCR Softstrips mit Cap-Strip à 8 Tubes, Sarstedt Nümbrecht

3. Methoden und methodenspezifisches Material

Pipettenspitzen, Sarstedt Nümbrecht (200 µl, gelb und 1000 µl, blau) und Biozym Scientific GmbH Hess. Oldendorf/Biozym Biotech Trading GmbH Wien (10 µl, farblos)

Reagenzien:

Green-Puffer 5%, Promega Madison USA

1.5 mM MgCl₂, Promega Madison USA

dNTPs, Fermentas, St. Leon-Rot

H₂O, Merck Darmstadt

Primer F und 54624 R bzw. Primer Fn und CHRNA4 Seq3 R, eurofins MWG Ebersberg

0.5 units GoTaq-Polymerase, Promega, Madison, USA

Durchführung:

Für jede DNA-Probe wird ein PCR-Ansatz aus folgenden Reagenzien hergestellt:

* 5 µl 5%-iger Green-Puffer

* 1.5 µl (1.5 mM) MgCl₂, gevortext

* 4 µl (0.2 mM je Nukleotid) dNTPs

* 10.4 µl H₂O

* je 1 µl (400 nM, 100 pmol/µl) PCR-Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimerlösung (Primer F und 54624 R für das Restriktionsenzym *Bcl*I oder Primer Fn und CHRNA4 Seq3 R für das Restriktionsenzym *Sdu*I, siehe Kapitel 4.4.2.)

--- Sammelansatz

* 2 µl DNA-Probe

* 0.1 µl (0.5 units) GoTag-Polymerase, gut gekühlt (zum Schluss dazugeben!)

Kleine Tube-Reihen werden mit wasserfestem Stift beschriftet, die PCR-Ansätze werden in die Tubes pipettiert, und man lässt zur Kontrolle bei jeder PCR eine „Wasserprobe“ W (Ansatz, der keine DNA enthält; eine Verunreinigung mit „Fremd-DNA“ kann so erkannt werden) mitlaufen; außerdem wird die PCR auch mit der „Mutationsprobe“ M (DNA mit bekannter *CHRNA4*-776ins3-Mutation, siehe Kapitel 2.4.) durchgeführt. Die Tube-Reihen werden verschlossen, kurz gevortext und dann in den Thermocycler gestellt.

In Abhängigkeit von den verwendeten PCR-Primern (siehe oben) musste die Anfangs-Annealing-Temperatur für die Touchdown-PCR ermittelt werden. Optimal war, bei Verwendung der Primer F und 54624 R eine PCR-Starttemperatur von 68 °C, bei Verwendung der Primer Fn und CHRNA4 Seq3 R eine Ausgangstemperatur von 63 °C.

Nachfolgend sind die einzelnen Schritte einer Touchdown-PCR mit einer Starttemperatur von 68 °C aufgeführt. Die Parameter werden am Thermocycler eingestellt.

1. 95 °C 2‘

2. 95 °C 25“

3. 68 °C 30“

4. 72 °C 45“

5. 95 °C 25“

6. 67 °C 30“

3. Methoden und methodenspezifisches Material

7. 72 °C 45“

8. 95 °C 25“

9. 66 °C 30“

10. 72 °C 45“

11. 95 °C 25“

12. 65 °C 30“

13. 72 °C 45“

14. 95 °C 25“

15. 64 °C 30“

16. 72 °C 45“

17. 95 °C 25“

18. 63 °C 30“

19. 72 °C 45“

20. go to 17. 29x

21. 72 °C 10“

22. 15 °C unendlich

Einflussgrößen/Störfaktoren:

Wichtig für das Funktionieren der PCR ist eine optimale Anfangs-Annealing-Temperatur, damit die Primer an den DNA-Strängen binden können (Temperatur nicht zu hoch) und spezifisch binden (Temperatur nicht zu niedrig).

Der Erfolg einer PCR wird durch Auflagen der PCR-Produkte auf Agarosegel getestet (siehe Kapitel 3.3.4.). Es sei auch auf Kapitel 4.4.3. im Ergebnisteil dieser Arbeit verwiesen, wo ein Beispiel für eine gelungene und eine nicht-gelungene PCR gezeigt wird.

3.3.4. Gelelektrophorese auf 1%-igem Agarosegel

Mithilfe der Agarosegelelektrophorese wird getestet, ob die PCR erfolgreich war und die gewünschten PCR-Produkte entstanden sind.

Beschreibung:

Bei den Elektrophoreseverfahren, zu denen neben der Agarose-Gelelektrophorese auch die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.3.6.) gehört, wandert die DNA aufgrund ihres negativ geladenen Phosphat-Rückgrates im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Große DNA-Fragmente wandern dabei langsamer und auf die Zeit bezogen weniger weit als kleinere DNA-Fragmente. Als Referenz lässt man eine DNA-Basenpaar-Leiter mitlaufen.

Trägermedien bei der Gelelektrophorese sind Agarose und Polyacrylamid (PAA), wobei diese Stoffe im Gelverbund ein engmaschiges Netz bilden, das die zu trennenden Moleküle bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld behindert (<http://flexikon.doccheck.com/de/Gelelektrophorese>).

3. Methoden und methodenspezifisches Material

Erleichtert wird das Auftragen der Proben auf die Gele durch Verwendung eines Grün-Puffers in der PCR zur Sichtbarmachung und Dichteerhöhung der Proben.

Agarosegele sind relativ großporig, und die Größe der Poren lässt sich durch die Agarosekonzentration steuern; so weisen 1%-ige Agarosegele eine Porengröße um 150 nm auf (<http://flexikon.doccheck.com/de/Gelelektrophorese>).

Zum Sichtbarmachen der gewanderten DNA-Moleküle auf dem Agarosegel dient Ethidiumbromid, welches zwischen die DNA-Basen interkaliert und mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden kann.

Geräte, Materialien, Reagenzien:

Geräte:

Waage, AC-100, Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Laborabzug, Waldner Wangen
Mikrowelle, M 638 EL, Miele & Co. KG, Gütersloh
Elektrophoresegerät, Agarosekammer Maxi blu (120 V/200 mA), biotech service blu, Schauenburg
UV-Lichtquelle, Biometra Göttingen
Magnetrührer, Ikamag REO, IKA Labortechnik, Staufen
Mikropipetten, Pipetman, Gilson, Villiersle-Bel, F

Materialien:

Glaszylinder 500 ml, Schott Duran Stafford, UK
Nitril-Handschuhe
Kunststoffrahmen mit Kämmen zum Gießen/Formen des Gels, biotech service blu, Schauenburg
Frischhaltefolie
Einmalskalpell
Augenschutz für UV-Licht
Pipettenspitzen, Sarstedt Nümbrecht (200 µl, gelb und 1000 µl, blau) und Biozym Scientific GmbH
Hess. Oldendorf/Biozym Biotech Trading GmbH Wien (10 µl, farblos)

Reagenzien:

Agarosepulver, low EEO (Agarose standard), AppliChem Darmstadt
TAE-Puffer; 250 ml 10-fach TAE-Puffer, mit H₂O auf 2.5 l aufgefüllt; Invitrogen™
10 mg/ml Ethidiumbromid, Sigma Deisenhofen
0.5 µg/µl 100 Bp-DNA-Leiter, Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus, MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Durchführung:

Als Erstes wird das Agarosegel hergestellt.

Dafür werden 3 g Agarosepulver abgewogen und unter dem Abzug in einen Glaszylinder gegeben, welcher dann mit TAE-Puffer auf 300 ml aufgefüllt wird. Der Glaszylinder wird leicht geschwenkt und mit einem kleinen Magneten versehen. Drei- bis viermal lässt man den Glaszylinder mit seinem Inhalt in der Mikrowelle kurz aufkochen bis die Lösung ganz klar ist; dabei wird der Glaszylinder nach jedem Aufkochen aus der Mikrowelle genommen und kurz hin und her geschwenkt (Handschutz!). Nach dem mehrmaligen Aufkochen in der Mikrowelle wird der Glaszylinder im Laborabzug für ca. 5 – 15 Min. bei 200 U/Min. auf einen Magnetrührer gestellt. Zur Lösung im Glaszylinder werden dann, noch während das Gefäß auf dem Magnetrührer steht, 15 µl Ethidiumbromid ge-

3. Methoden und methodenspezifisches Material

geben (Nitril-Handschuhe verwenden!). Man belässt die Lösung noch ca. 5 weitere Min. auf dem Magnetrührer.

Das fertige, noch flüssige Gel wird anschließend aus dem Glaszylinder in einen dafür vorbereiteten Kunststoffrahmen gegossen. Zum Erzeugen der Gelschlitze werden spezielle Kämmen in den Rahmen und das Gel gesteckt. Man lässt das gegossene Gel für ca. 20 Min. im Abzug stehen, damit es fest werden kann. Anschließend werden die Kämmen und die seitlichen Begrenzungen des Gelrahmens entfernt, das Gel mit Frischhaltefolie abgedeckt und zur Aufbewahrung in den Kühlschrank gestellt.

Für die Gelelektrophorese wird ein Stück des hergestellten 1%-igen Agarosegels mit einem Skalpell abgeschnitten und in das, mit TAE-Pufferlösung gefüllte Elektrophoresegerät gelegt. Jeweils einige wenige μl jeder der Proben eines PCR-Durchlaufs werden zusammen mit der „Wasserprobe“ W und einer 100 Bp-DNA-Leiter in die Gelschlitze pipettiert; dafür verwendet man jeweils 5 μl der PCR-Proben und 6 μl der DNA-Leiter. Am Elektrophoresegerät wird eine Stromstärke von 190 mA eingestellt, und die DNA wandert für 30 – 40 Min. im elektrischen Feld (siehe Beschreibung).

Nach abgeschlossener Elektrophorese wird das Gel vorsichtig aus dem abgeschalteten Gerät genommen und im abgedunkelten Raum unter UV-Licht betrachtet (Augenschutz!) (Beispiele siehe Kapitel 4.4.3.).

Einflussgrößen/Störfaktoren:

Siehe Kapitel 3.3.3..

3.3.5. Restriktionsenzymverdau

War die PCR erfolgreich, so folgt der Restriktionsenzymverdau.

Beschreibung:

Restriktionsenzyme sind kleine Proteine aus prokaryontischen Zellen, die bestimmte DNA-Sequenzen erkennen, und die die DNA schneiden können, man bezeichnet sie auch als molekulares Schneidewerkzeug (<http://flexikon.doccheck.com/de/Restriktionsenzym>). Es gibt verschiedene Typen von Restriktionsenzymen, und die Restriktionsenzyme vom Typ II schneiden exakt an einer palindromischen Erkennungssequenz, d.h. an einer Sequenz, die von beiden Seiten aus gelesen gleich ist (<http://flexikon.doccheck.com/de/Restriktionsenzym>).

Hintergrund der Verwendung eines Restriktionsenzymen in dieser Arbeit ist, dass durch die Anwesenheit einer Mutation, eine neue Restriktionsenzym-Erkennungssequenz und –Schneidestelle geschaffen werden kann, die ohne diese Mutation nicht besteht oder dass eine vorher bestehende Schneidestelle durch die Mutation wegfällt. Welches Restriktionsenzym aus einer großen Auswahl verfügbarer Restriktionsenzyme dafür geeignet ist, die gesuchte *CHRNA4-776ins3*-Mutation im Patientenpool aufzudecken, musste erst ermittelt werden; dieser Vorgang wird in Kapitel 4.4.1. genauer beschrieben.

Geräte, Materialien, Reagenzien:

Geräte:

Vortexer, Genie 2 TM, Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Tischzentrifuge, Mini Microcentrifuge, Corning/LSETM
Thermocycler, PC-Personal Cyler, Biometra Göttingen

3. Methoden und methodenspezifisches Material

Mikropipetten, Pipetman, Gilson, Villiersle-Bel, F

Materialien:

Eppendorf-Tubes 1.5 ml, Sarstedt Nümbrecht

Styroporbox mit Eis

PCR-Tube-Reihen 0.2 ml, PCR Softstrips mit Cap-Strip à 8 Tubes, Sarstedt Nümbrecht

Pipettenspitzen, Sarstedt Nümbrecht (200 µl, gelb und 1000 µl, blau) und Biozym Scientific GmbH Hess. Oldendorf/Biozym Biotech Trading GmbH Wien (10 µl, farblos)

Reagenzien:

Puffer des jeweiligen Restriktionsenzym, Fermentas St. Leon-Rot

FastDigestTM-Restriktionsenzym *BclI* #FD0724 300 µl, Fermentas St. Leon-Rot

10 units/µl Restriktionsenzym *SduI* #ER0651 500u, Fermentas St. Leon-Rot

H₂O, Merck Darmstadt

Durchführung:

Folgende Reagenzien werden gemischt:

- * 1 µl 10-fach-Puffer für Restriktionsenzym *BclI* bzw. *SduI*, gevortext
- * 5 units des Restriktionsenzym, d.h. 1 µl *BclI* bzw. 0.5 µl *SduI*, eisgekühlt
- * 2 µl H₂O im Fall von *BclI* bzw. 2.5 µl H₂O im Fall von *SduI*
- Sammelansatz
- * 6 µl des jeweiligen PCR-Produktes

Die Ansätze werden kurz zentrifugiert und dann bei 37 °C im Thermocycler inkubiert, und zwar 5 Min. lang bei Verwendung des FastDigest-Restriktionsenzym *BclI* und 2 Std. lang bei Verwendung von *SduI*.

3.3.6. Gelelektrophorese auf Polyacrylamidgel

Die „verdauten“ Proben werden auf Polyacrylamidgel aufgetragen.

Beschreibung:

Zur Gelelektrophorese allgemein siehe Kapitel 3.3.4..

Polyacrylamidgele (PAA-Gele) besitzen deutlich kleinere Poren als Agarosegele; die Porengröße liegt hier zwischen 3 und 6 nm (<http://flexikon.doccheck.com/de/Gelelektrophorese>). PAA als Trägermaterial für die Gelelektrophorese besitzt das höchste Auflösungsvermögen (Dechert, 2012). „Um PAA-Gele herzustellen, benötigt man ein bestimmtes Mischungsverhältnis von Acrylamid und Bisacrylamid. Abhängig von deren Konzentration, sowie deren Verhältnis zueinander, variieren der Vernetzungsgrad und die Trennbereiche der Gele. Die Polymerisationsreaktion verläuft in Gegenwart von Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED. Letzteres katalysiert die Bildung freier Radikale aus dem Persulfat, welche diesen Prozess initiieren und beschleunigt auf diese Weise die Reaktion (Ibelgaufits, 1993).“ (Hendrich, 2011)

Zum Sichtbarmachen des Ergebnisses auf dem Gel dient in dieser Arbeit die im folgenden Kapitel beschriebene Silberfärbung:

3. Methoden und methodenspezifisches Material

Geräte, Materialien, Reagenzien:

Geräte:

Laborabzug, Waldner Wangen
 Magnetrührer, Ikamag REO, IKA Labortechnik, Staufen
 Elektrophoresegerät, Multigel-Long-Gelkammer, Biometra, Göttingen
 Tischzentrifuge, Mini Microcentrifuge, Corning/LSE™
 Mikropipetten, Pipetman, Gilson, Villiersle-Bel, F

Materialien:

Glasscheiben für das Gießen der Polyacrylamidgele incl. Zubehör (Gummis, Klammern, Kämme), Biometra, Göttingen
 Papiertücher aus Zellstoff, Verschiedene
 Glaszylinder 80 ml, Schott Duran Stafford, UK
 Frischhaltefolie
 Plastikeinwegpipetten, Fine Tip Pastette NS, alphalaboratories, Hampshire, UK
 Einmalskalpell
 Glasschale
 Pipettenspitzen, Sarstedt Nümbrecht (200 µl, gelb und 1000 µl, blau) und Biozym Scientific GmbH Hess. Oldendorf/Biozym Biotech Trading GmbH Wien (10 µl, farblos)

Reagenzien:

Alkohol zum Reinigen
 Stocklösung: 50 ml Bisacrylamid 2% (Bio-Rad Hercules USA), 122.5 ml Acrylamid 40% (Bio-Rad Hercules USA), 500 µl TEMED (Sigma), ad 500 ml mit 0.5-fach TBE-Puffer
 Glyzerol 5%, Sigma-Aldrich Deisenhofen
 APS, Sigma-Aldrich Deisenhofen
 0.5-facher TBE-Puffer, Invitrogen
 0.5 µg/µl 50 Bp-DNA-Leiter, MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Durchführung:

Als Erstes werden auch hier die Gele hergestellt.

Die für das Gießen der Polyacrylamidgele vorgesehenen Glasscheiben werden mit Alkohol gereinigt, zwischen jeweils zwei der Glasscheiben wird am Rand ein spezieller Gummi gelegt, und die beiden Glasscheiben werden mit größeren Klammern aneinander fixiert. Es werden gleichzeitig vier Gele hergestellt (Sammelansatz mit drei!-facher Menge für vier Gele), so dass insgesamt acht Glasscheiben dazu benötigt werden.

Im Laborabzug werden für ein Gel 20 ml Stocklösung in einen 80 ml-Glaszylinder gefüllt, es wird je Gel 1 ml 5%-iges Glyzerol dazupipettiert, und es kommt ein kleiner Magnet in den Glaszylinder, damit die Lösung auf dem Magnetrührer gemischt werden kann. Danach werden pro Gel 250 µl APS in den Glaszylinder pipettiert, und das Ganze wird erneut gemischt.

Anschließend gießt man das flüssige Gel in die vorbereiteten „Gelschablonen“, d.h. jeweils zwischen die beiden aneinander fixierten Glasscheiben. Zum Erzeugen der Geldaschen steckt man einen speziellen Kamm von oben in das Gel. Man legt die gegossenen Gele leicht schräg in den Abzug und lässt sie dort 45 Min. lang fest werden. Nach dieser Zeit werden die Klammern entfernt, es wird ein feuchtes Papiertuch auf die „Kammseite“ des Gels gelegt, und die Gele werden mit Frischhaltefolie eingewickelt (befinden sich noch immer in den „Glasrahmen“!), so dass sie im Kühlschrank aufbewahrt werden können.

3. Methoden und methodenspezifisches Material

Für die Gelelektrophorese wird zunächst ein 0.5-facher TBE-Puffer in das „untere Fach“ einer Elektrophoresekammer gefüllt, wobei die weißen Stopfen der Kammer vom Puffer bedeckt sein müssen. Je zwei gegossene Polyacrylamidgele werden, nach dem Entfernen der Gummis und Kämme (die „Glasrahmen“ bleiben um die Gele!), einander gegenüber in die Elektrophoresekammer gestellt, und zwar so, dass sich zwischen dem Boden der Kammer und den Gelen keine Luftblasen befinden. Dann wird auch das „obere Fach“ der Kammer mit TBE-Puffer gefüllt bis die Geltaschen ganz vom Puffer bedeckt sind. Mithilfe einer Plastikeinwegpipette werden die Geltaschen geöffnet und von darin enthaltenen Luftblasen befreit. Insgesamt besitzt ein Polyacrylamidgel 24 Geltaschen, in die nun folgender Inhalt pipettiert wird: in eine Tasche kommen 6 µl einer 50 Bp-DNA-Leiter, in eine Tasche 10 µl einer „unverdauten“ PCR-Probe, in eine weitere Tasche 10 µl der „verdauten“ „Mutationsprobe“ M und in die restlichen Geltaschen jeweils 10 µl der „verdauten“ und zu analysierenden PCR-Proben (Proben vorher nochmal kurz zentrifugieren!). Nach dem Füllen der Geltaschen wird eine Spannung von 200 V ans Elektrophoresegerät angelegt, und man sieht kleine Bläschen im Gerät aufsteigen. Das Gerät wird nach ca. 2 Std. abgestellt, wenn die unterste blaue Bande der 50 Bp-Leiter fast „aus dem Gel fällt“.

Die Gele werden aus dem Elektrophoresegerät genommen, mithilfe eines Skalpell vorsichtig von ihrer „Glashülle“ befreit und in einem nächsten Schritt gefärbt:

3.3.7. Silberfärbung

Durch die Silberfärbung der Polyacrylamidgele werden die DNA-Banden auf den Gelen sichtbar gemacht, und das Ergebnis der Genanalyse kann abgelesen werden.

Beschreibung:

Diese Färbung ähnelt der früher in der Schwarz-Weiß-Fotografie verwendeten Reaktion (http://chemgapedia.de/vsengine/popup/vsc/de/glossar/s/si/silberf_00228rbung.glos.html).

Nach Fixieren und Ansäuern der fertiggestellten Gele werden diese mit Silbernitratlösung versetzt/gefärbt, d.h. positive Silberionen lagern sich an die negativ geladenen Phosphatreste der DNA an (Ladehoff, 2007). Überschüssige Silberionen werden mit Wasser weggespült, und es wird als Entwicklerlösung Natriumcarbonat und Formaldehyd zugefügt, wodurch Ameisensäure entsteht, die wiederum die Silberionen reduziert, welche nach Aufnahme der Elektronen als schwarzbraune elementare Silberatome ausfallen. Die Zugabe von Essigsäure stoppt die Redoxreaktion (Ladehoff, 2007).

Geräte, Materialien, Reagenzien:

Geräte:

Schüttelapparat, GFL 3016, Burgwedel, D oder Mini-Rocker Shaker MR-1, lab4you GmbH, Berlin
 Fotoapparat, PowerShot G10, Canon, Tokyo, Japan und FinePix F20 Digital Camera, Fujifilm, Tokyo, Japan
 Mikropipetten, Pipetman, Gilson, Villiersle-Bel, F

Materialien:

Glasschale
 Einmalhandschuhe
 Glasplatte
 Pipettenspitzen, Sarstedt Nümbrecht (200 µl, gelb und 1000 µl, blau) und Biozym Scientific GmbH

3. Methoden und methodenspezifisches Material

Hess. Oldendorf/Biozym Biotech Trading GmbH Wien (10 µl, farblos)

Reagenzien:

Ethanol 10%, Merck Darmstadt
HNO₃ 1%, AppliChem Darmstadt
AgNO₃ 0.2%, Merck Darmstadt
Aqua dest., AppliChem Darmstadt
Formaldehyd, Sigma-Aldrich Deisenhofen
60 g/2 l Na₂CO₃, Merck Darmstadt
Essigsäure 10%, Sigma-Aldrich Deisenhofen

Durchführung:

Die Silberfärbung erfolgt in einer Glasschale, welche während des gesamten Färbevorgangs auf einem Schüttelapparat sanft hin und her geschwenkt wird.

Die Schritte „Füllen der Glasschale“, „Inkubieren des Gels“ und „Abschütten der Lösung“ werden nacheinander mit folgenden Parametern durchgeführt: 1.) 10%-iger Ethanol, Inkubation für 10 Min., 2.) 1%-iges HNO₃ (Salpetersäure), Inkubation für 10 Min., 3.) 0.2%-iges AgNO₃ (Silbernitrat), Inkubation für 30 Min., cave! Wechseln der Handschuhe nach dem Abschütten der Lösung/Zurückhalten des Gels, 4.) dreimaliger Durchgang mit Aqua dest., Inkubation für jeweils 1 Min., cave! auch hier Wechseln der Handschuhe nach dem Abschütten.

Während des ersten Durchgangs bzw. der ersten Inkubationszeit mit Aqua dest. werden 675 µl Formaldehyd in ein Fläschchen mit 500 ml Na₂CO₃ (Natriumcarbonat) pipettiert und diese „Entwicklerlösung“ kurz geschüttelt. Nach dem dritten Aqua dest.-Durchgang wird der vorbereitete „Entwickler“ dann zum Gel in die Glasschale gegeben, jedoch nicht auf einmal, sondern zu drei, in etwa gleich großen Mengen; dabei achtet man darauf, dass man die Lösung jeweils abkippt, wenn sie beim ersten Mal gelblich, beim zweiten Mal bräunlich wird, und sich beim dritten Mal ein leichtes Bandenmuster zeigt.

Anschließend wird eine 10%-ige Essigsäurelösung in die Glasschale gefüllt und das Gel für 10 Min. darin inkubiert.

Das fertig gefärbte Gel wird vorsichtig aus der Glasschale genommen und auf eine auf dem Tisch liegende Glasplatte gelegt. Jetzt kann anhand des sichtbar gewordenen Bandenmusters das Ergebnis der Genanalyse abgelesen werden und das Gel zur Ergebnisdokumentation abfotografiert werden. In Kapitel 4.4.4. sind die gefärbten Polyacrylamidgele abgebildet.

4. Ergebnisse

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisübersicht

Tabelle 6 fasst das Ergebnis der Dissertation zusammen. Die fett-markierten Chromosomenveränderungen werden im folgenden Kapitel 4.2. beschrieben.

Tabelle 6 Ergebnisübersicht

Probenbezeichnung (und ICD-10- Diagnose bei Nicht- Schizophreniepa- tienten)	Geschlecht [w = weib- lich, m = männlich]	Erkran- kungsalter [in Jahren]	Anzahl ana- lysierter Mitosen (Karyotypi- sierung)	Auffälligkeiten bei der Karyotypisierung	Auffällig- keiten bei der FISH (jeweils 10 analyzierte Mitosen)	Auffällig- keiten bei der Genana- lyse
SGN 5194 PP	w	10	10x	t(5;9;16)? in einer Mitose, t(2;8;11)? in einer anderen Mitose	Keine	Keine
SGN 5198 PP	m	16	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 5201 PP	w	16	35x	Komplexe chromosomale Aberration; 47,+12 in einer Mitose, 47,+16 in einer anderen Mitose	Keine	Keine
SGN 5205 PP	w	9	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 5129 PP	m	15	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 5159 PP	m	15	30x	Sequenzielle Chromosomenveränderungen	Keine	Keine
SGN 5199 PP	m	16	10x	der(3) in einer Mitose	Keine	Keine
SGN 5030 PP	w	15	10x	Keine	Keine (Inter- phase-FISH)	Keine
SGN 5033 PP	m	15	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 5094 PP	m	16	10x	Keine	Keine	Keine

4. Ergebnisse

SGN 5192 PP	w	16	10x	47,nicht zuzuordnende Veränderung in einer Mitose	Keine	Keine
SGN 5098 PP	m	13	8x	Keine	Keine	Keine
SGN 5138 PP	w	15	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 5150 PP	m	16	10x	Keine	Keine (z.T. Interphase-FISH)	Keine
SGN 5202 PP	m	16	10x	inv(14) in einer Mitose	Keine	Keine
SGN 5250 PP	m	16	10x	ace(13;?14) in einer Mitose	Keine	Keine
SGN 5264 PP	w	15	10x	der(?X) in einer Mitose, 47,+15 in einer anderen Mitose	Keine	Keine
SGN 5222 PP	m	14	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 5251 PP	w	16	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 5255 PP	m	15	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 5304 PP	m	16	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 5275 PP	m	15	10x	Marker und Auffälligkeit des Y-Chromosoms	Keine	Keine
SGN 5332 PP	m	16	8x	Keine	Keine	Keine
SGN 5383 PP	m	14	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 5346 PP	m	16	8x	Keine	Keine	Keine
SGN 5391 PP	m	14	10x	t(1;X) in einer Mitose	Keine	Keine
SGN 5402 PP	m	14	30x+40x (aus neuer Charge)	Mosaik-Trisomie 12	Keine	Keine
SGN 5406 PP	m	14	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 5345 PP	m	16	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 5473 PP	m	16	20x	Durchgehende Inversion inv(1)(p31q25)	Keine	Keine
SGN 5424 PP	m	16	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 5459 PP	m	14	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 5375 PP	m	16	10x	Fraglicher Marker und del(16) in einer Mitose, dic(5;15) in einer anderen Mitose	Keine	Keine

4. Ergebnisse

SGN 5488 PP	m	8	10x	dic(10;12) in einer Mitose	Keine	Keine
SGN 5491 PP	m	15	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 5478 PP	m	10	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 5339 PP	m	14	10x	del(16) in einer Mitose	Keine	Keine
SGN 5495 PP	m	13	30x	dic(10;17)? in einer Mitose, 47,+12 in einer anderen Mitose	Keine	Keine
SGN 5187 PP	m	16	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 5377 PP	m	15	10x	dic(9;10;17), t(10;17) in einer Mitose	Keine	Keine
SGN 5452 PP	m	15	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 5057 PP	m	14	10x	Heterochromatinvariante Chromosom 9p	Keine	Keine
SGN 5299 PP	m	14	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 5437 PP	m	16	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 5448 PP	m	16	9x	Keine	Keine	Keine
SGN 5547 PP	w	16	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 5554 PP	m	16	0x	Keine Karyotypisierung möglich	Keine	Keine
SGN 5562 PP	m	16	0x	Keine Karyotypisierung möglich	Keine (Interphase-FISH)	Keine
SGN 5563 PP	m	17	0x	Keine Karyotypisierung möglich	Keine	Keine
SGN 5558 PP	m	14	10x	Keine	Keine (z.T. Interphase-FISH)	Keine
SGN 5627 PP	m	10	0x	Keine Karyotypisierung möglich	Keine	Keine
SGN 6207 AB	m	Entfällt (gesunder Bruder eines juvenilen Schizophreniepatienten)	10x	Keine	Keine	Keine

4. Ergebnisse

SGN 3008	m	13	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3026	w	11	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3029	m	17	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3039	m	14	10x	Heterochromatinvariante Chromosom 9p	Keine	Keine
SGN 3049	m	16	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3053	m	18	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3057	m	16	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3067	m	14	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3111	m	17	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3112	w	16	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3123	m	18	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3210	w	16	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3217	m	16	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3219	m	16	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3169	m	17	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3170	m	7	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3009	m	17	10x	del(16) in einer Mitose	Keine	Keine
SGN 3087	w	15	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3163	m	15	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3164	m	11	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3015	w	12	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3031	w	15	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3230	m	15	30x	47,+22 in einer Mitose	Keine	Keine
SGN 3160	m	16	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3099	m	18	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3022	w	16	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3051	m	15	0x	Keine Karyotypisierung möglich	Keine (Interphase-FISH)	Keine

4. Ergebnisse

SGN 3109	m	17	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3168	m	12	10x	t(11;12) in einer Mitose	Keine	Keine
SGN 3213	m	16	8x	Keine	Keine	Keine
SGN 3225	m	15	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3232	w	16	10x	dic(10;20), -ace(10;20) in einer Mitose	Keine	Keine
SGN 3242	m	18	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3246	m	17	10x	t(5;8) in einer Mitose	Keine	Keine
SGN 3252	m	18	10x	del(1) in einer Mitose	Keine	Keine
SGN 3255	m	16	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3256	w	16	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3228	m	16	10x	Keine	Keine	Keine
SGN 3259	w	16	10x	Keine	Keine (Inter-phase-FISH)	Keine
SGN 3260	m	14	10x	Keine	Keine (Inter-phase-FISH)	Keine
A1	m	17	10x	Keine	Keine	Keine
A2	m	17	10x	Keine	Keine	Keine
A3	w	15	10x	der(X)t(X;22) in einer Mitose	Keine	Keine
A4	m	16	10x	Keine	Keine	Keine
A5, DD Stoffwechselerkrankung/Neuroborreliose	w	10	10x	Keine	Keine	Keine
A6, F32.3 DD F25	w	14	10x	Keine	Keine	Keine
A8	w	16	10x	Keine	Keine	Keine
A9, F25 DD F20.0	m	14	10x	Keine	Keine	Keine
A10, F31.1	w	16	10x	Keine	Keine	Keine
A11	m	12	10x	Keine	Keine	Keine
A12, F31.1	m	15	10x	Keine	Keine	Keine

4. Ergebnisse

A13	m	15	10x	Keine	Keine	Keine
A14	w	13	10x	Keine	Keine	Keine
A15	w	15	0x	Keine Karyotypisierung möglich	Keine FISH möglich	Keine
A16, F25.2 (DD F23.1)	w	14	10x	Keine	Keine	Keine
A17, F23.2 DD F20.0	m	16	10x	Heterochromatinvariante Chromosom Yq	Keine	Keine
A18	m	15	0x	Keine Karyotypisierung möglich	Keine FISH möglich	Keine

F20.0: Paranoide Schizophrenie

F23.1: Akute polymorphe psychotische Störung mit Symptomen einer Schizophrenie

F23.2: Akute schizophrenieforme psychotische Störung

F25.-: Schizoaffective Störungen

F25.2: Gemischte schizoaffective Störung

F31.1: Bipolare affektive Störung, gegenwärtig manische Episode ohne psychotische Symptome

F32.3: Schwere depressive Episode mit psychotischen Symptomen

4. Ergebnisse

4.2. Chromosomenanalyse

Als Erstes wurden die Chromosomen der Probanden untersucht. Es ging darum herauszufinden, ob numerische oder strukturelle Chromosomenveränderungen vorliegen, die mit der Schizophrenie in Zusammenhang stehen könnten.

Ziel war es, von jedem Probanden zehn Mitosen zu analysieren. Wurden relevante Auffälligkeiten gefunden, so wurden bis zu 40 weitere Mitosen ausgewertet.

Bei den Proben SGN 3051, SGN 5554 PP, SGN 5562 PP, SGN 5563 PP, SGN 5627 PP, A15 und A18 gelang es nicht, eine derartige Qualität der Mitosen zu erzeugen, die für die Karyotypisierung erforderlich gewesen wäre. Diese Proben wurden daher nur auf die Mikrodeletion 22q11.2 und auf die Genmutation *CHRNA4-776ins3* hin, bzw. im Falle von A15 und A18 nur auf die *CHRNA4-776ins3*-Mutation hin, analysiert (siehe die Kapitel 4.3 und 4.4).

Bei allen anderen 102 Proben wurde eine Chromosomenanalyse durchgeführt. Das Ergebnis wird in den folgenden Unterkapiteln dargestellt:

4.2.1. Inversion *inv(1)(p31q25)*

Bei einem Probanden war eine perizentrische Inversion an einem der beiden Chromosomen 1 auffällig, die in allen 20 analysierten Mitosen gefunden werden konnte. Die Abb. 7 zeigt das auffällige Karyogramm des Patienten mit der Studiennummer SGN 5473 PP:

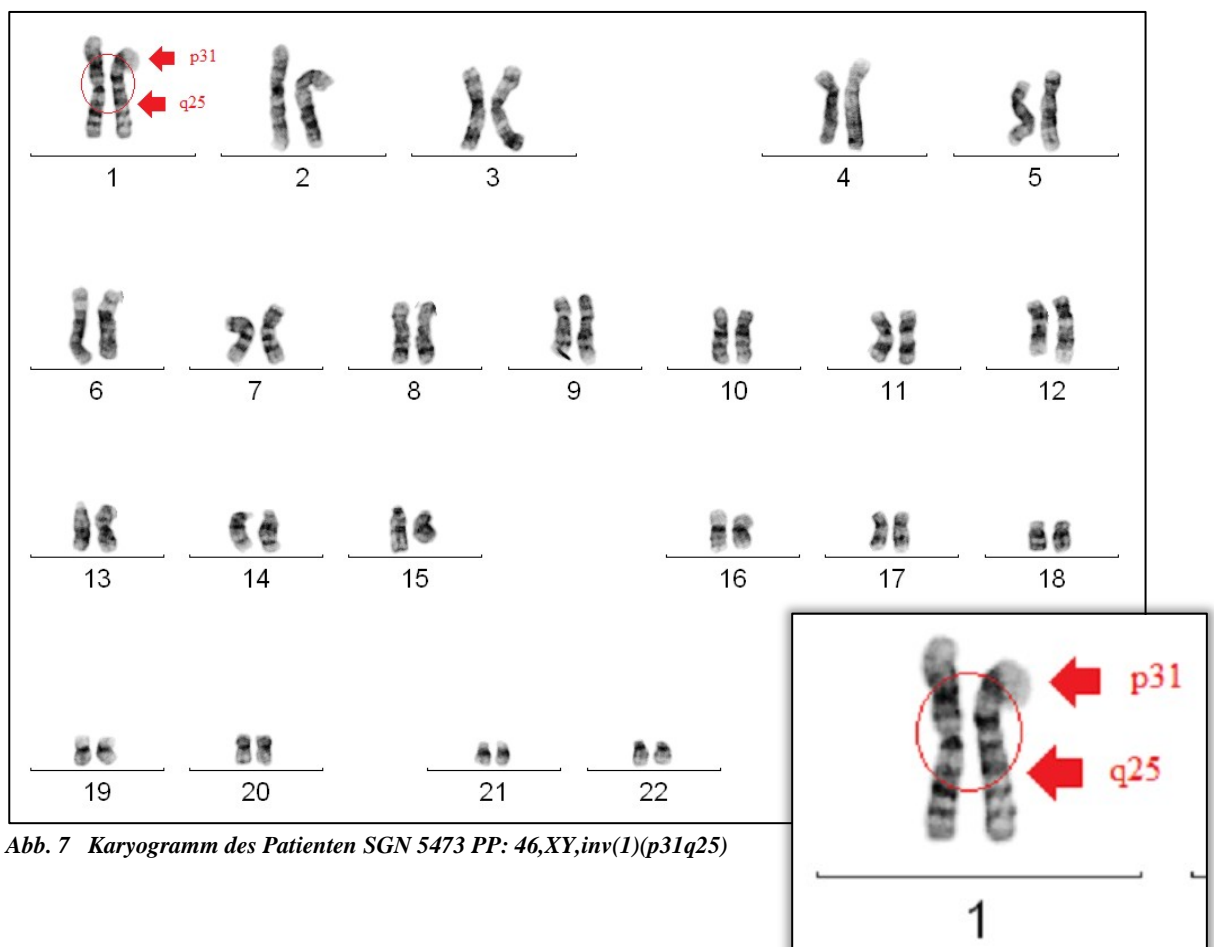


Abb. 7 Karyogramm des Patienten SGN 5473 PP: 46,XY,*inv(1)(p31q25)*

4. Ergebnisse

Bei der betroffenen Person handelt es sich um einen Schizophreniepatienten, bei dem im Alter von 16 Jahren die prodromalen Symptome der Erkrankung begannen, und bei dem mit 20 Jahren die Diagnose einer hebephrenen Schizophrenie (zu den Schizophreniesubtypen siehe Kapitel 1.4.) gestellt wurde. Im gleichen Alter nahm er an der vorliegenden Studie teil. Der Verlauf der Erkrankung war und ist ein kontinuierlicher Verlauf mit einer deutlichen Negativsymptomatik. Symptome der Erkrankung sind hier außerdem: Wahn, desorganisierte Sprache, Ich-Störung, Konzentrations- und Gedächtnisstörung sowie Angstzustände. Die Therapie der Schizophrenie erfolgte zuletzt mit Solian (Wirkstoff Amisulprid) und Leponex (Clozapin).

Weitere psychiatrische Diagnosen des Patienten waren/sind: emotional-instabile Persönlichkeitsstörung (F60.30), Cannabisabusus (F12.1) und Alkoholabusus (F10.1).

An körperlichen Auffälligkeiten besitzt der Patient einen nicht näher bezeichneten angeborenen Herzfehler sowie eine Pinealiszyste (Zufallsbefund). Es besteht der Verdacht auf ein WPW-Syndrom. Eine erhöhte Infektanfälligkeit ist nicht beschrieben.

Zu Schulzeiten fiel der Proband durch ein gestörtes Sozialverhalten sowie durch verbale und körperliche Aggressivität auf. Der Patient ist ledig und kinderlos, hat seine Lehre abgebrochen und ist wohnungslos.

4.2.2. Heterochromatinvarianten...

4.2.2.1. ...des Chromosoms 9

Bei den beiden Patientenproben SGN 5057 PP und SGN 3039 fand sich in der Karyogrammanalyse die gleiche Auffälligkeit, und zwar eine durchgehende Verlängerung des p-Arms von jeweils einem der beiden Chromosomen 9:

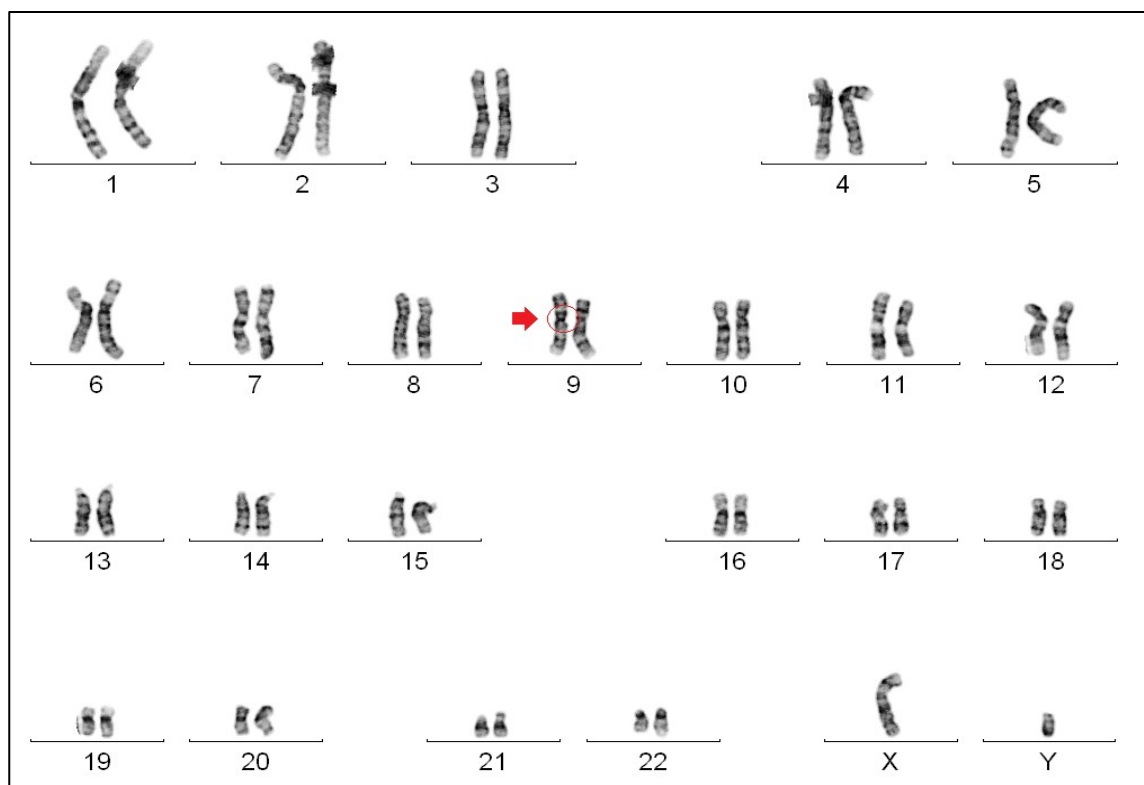


Abb. 8 auffällige Patientenprobe SGN 5057 PP

4. Ergebnisse

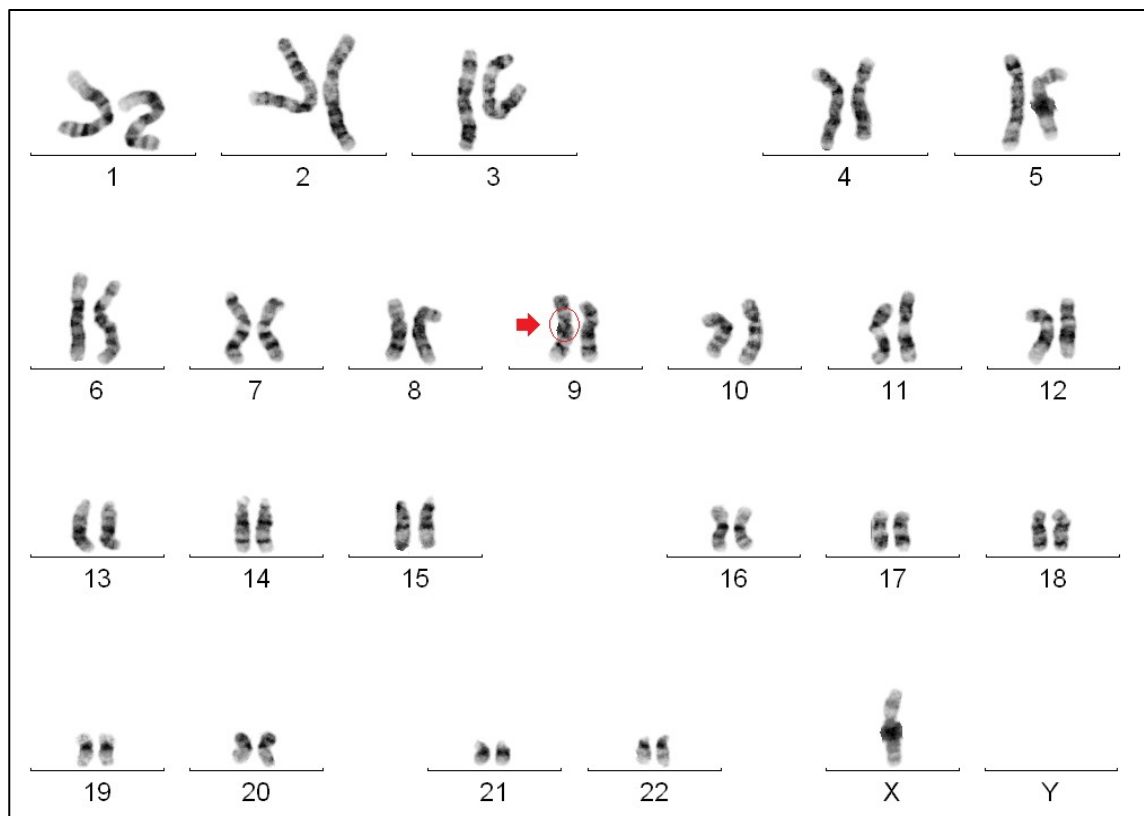


Abb. 9 auffällige Patientenprobe SGN 3039

Um zu differenzieren, ob es sich bei dieser Auffälligkeit um das Vorhandensein von zusätzlichem genetischem Material (z.B. verursacht durch die Duplikation eines Chromosomenabschnitts) oder um das Vorhandensein von verlagertem/transponiertem Heterochromatinmaterial (d.h. um eine Normvariante Gen-armen, hochspiralisierten Erbmaterials) handelte, wurden die Distamycin-DAPI-Färbungen der beiden Proben untersucht (zur Beschreibung der Distamycin-DAPI-Färbung siehe Kapitel 3.1.3.2.). Die Distamycin-DAPI-Färbung stellt u.a. das perizentromerische Heterochromatin von Chromosom 9q12 dar.

Die Abb. 10 und 11 zeigen ein Fluoreszieren des Heterochromatins jeweils einmal im p-Arm und einmal im q-Arm von Chromosom 9, so dass eine Transposition von Heterochromatin vom q- in den p-Arm beim auffälligen Chromosom bewiesen war:

4. Ergebnisse

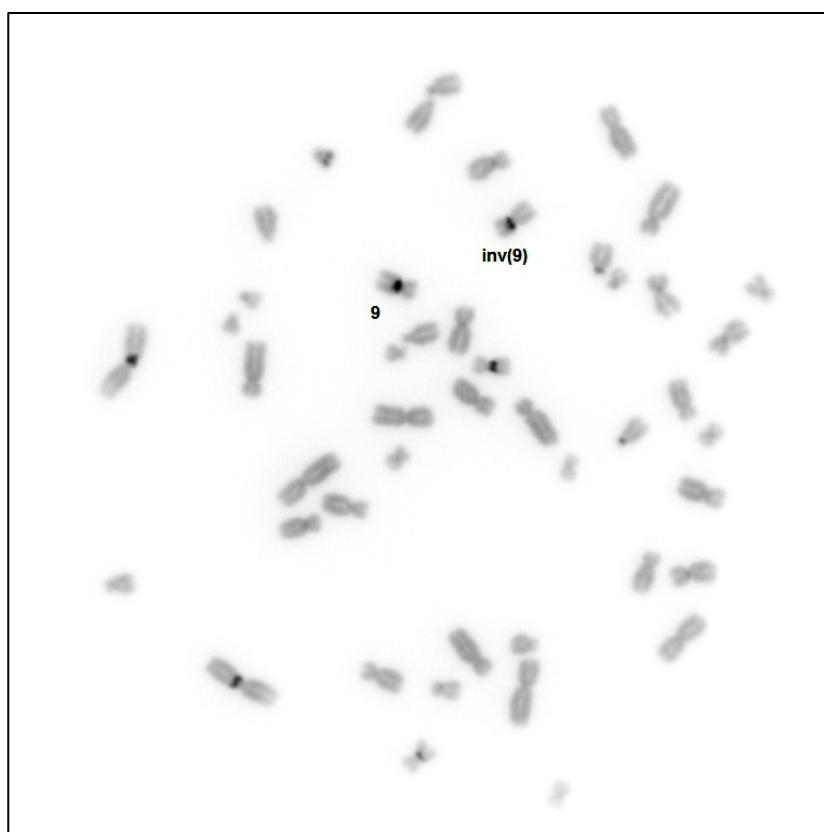


Abb. 10 Distamycin-DAPI-Färbung von SGN 5057 PP: inv(9) (p11q13)

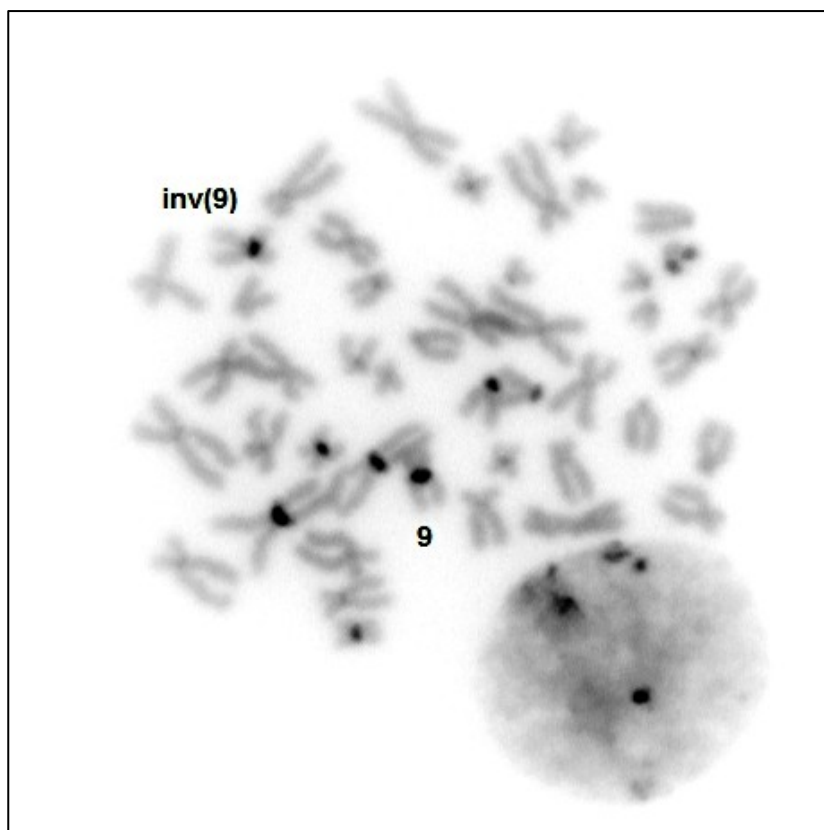


Abb. 11 Distamycin-DAPI-Färbung von SGN 3039: inv(9) (p11q13)

4. Ergebnisse

4.2.2.2. ...des Y-Chromosoms

Das Y-Chromosom der Probe A17 fiel durch seine ungewöhnliche Größe auf. In der Distamycin-DAPI-Färbung konnte ein besonders großer Heterochromatinbereich Yq12 dargestellt werden.

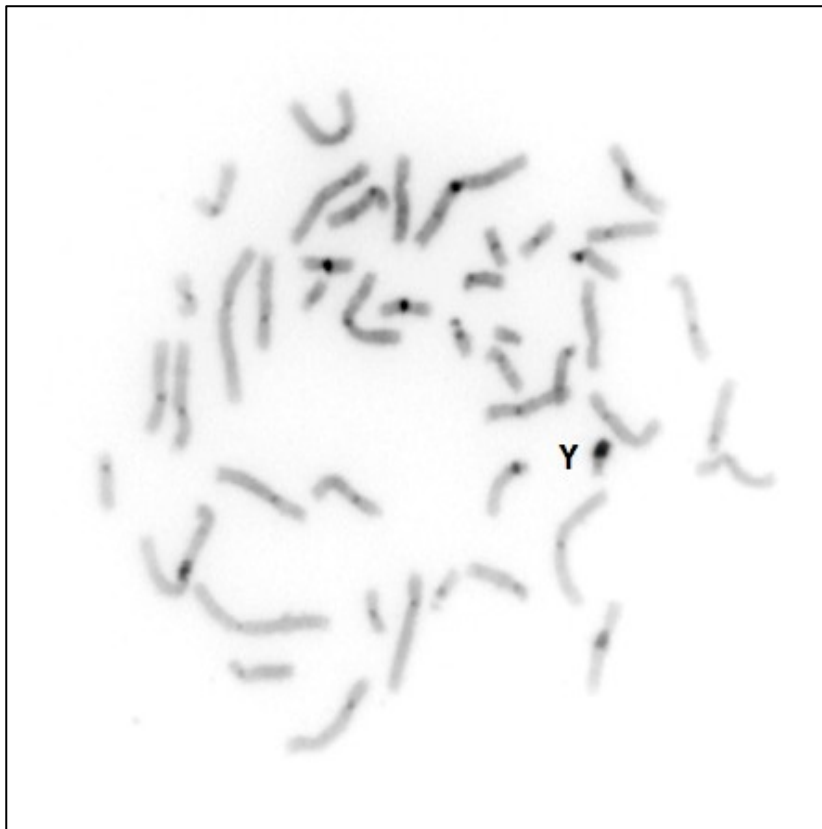


Abb. 12 Chromosomale DAPI-Gegenfärbung nach FISH, Probe A17: Yqh+

4.2.3. Marker und Auffälligkeit des Y-Chromosoms

Beim Patienten mit der Studiennummer SGN 5275 PP war bei drei von zehn Mitosen ein Marker auffällig (in einer Mitose waren zwei Marker zu finden), welche(r) aufgrund des schlechten Zellmaterials jedoch leider nicht weiter eingeordnet werden konnte(n).

4. Ergebnisse

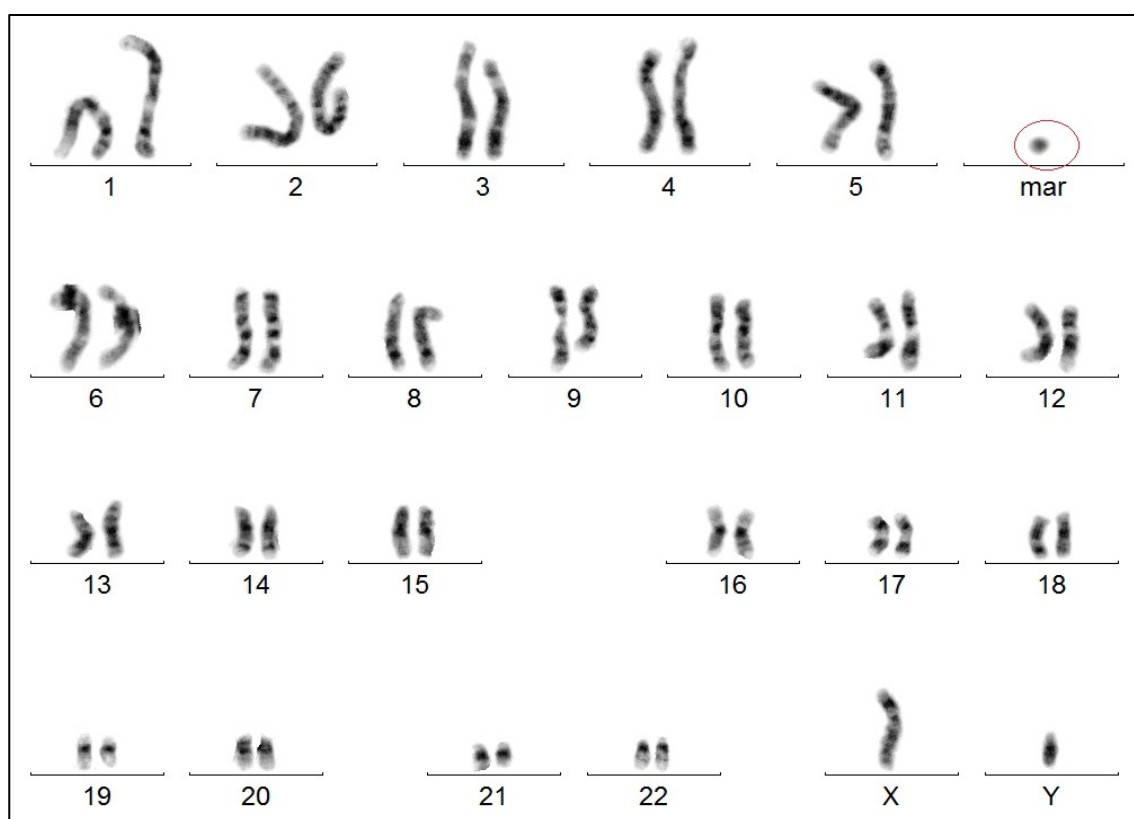


Abb. 13 Karyogramm des Patienten SGN 5275 PP: 46,XY,+mar

Der gleiche Proband zeigte eine nicht konsistente, auch hier nicht exakt einzuordnende Auffälligkeit des Y-Chromosoms, am ehesten einer Inversion entsprechend. Von dieser Auffälligkeit waren drei der zehn Mitosen betroffen.

4. Ergebnisse

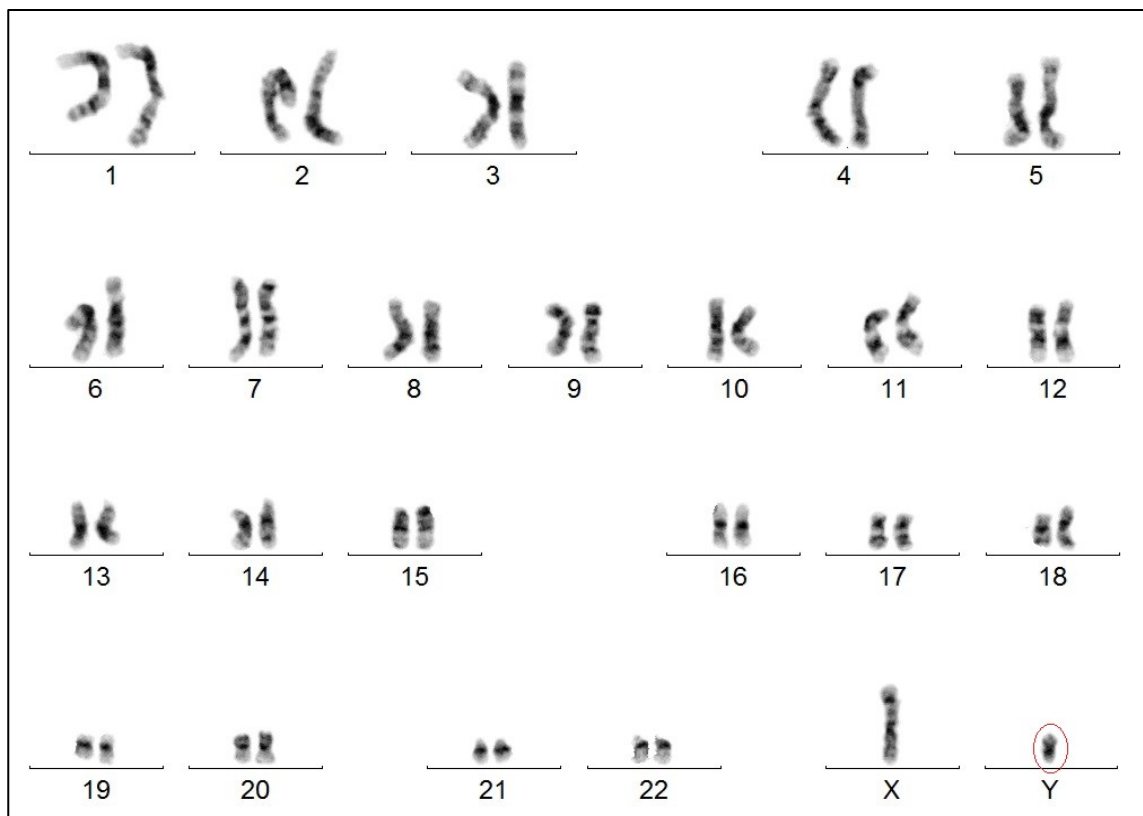


Abb. 14 Karyogramm des Patienten SGN 5275 PP, hier mit auffälligem Y-Chromosom

4.2.4. Mosaik-Trisomie 12 - ein Kulturartefakt

Bei einer Probe wurde eine Trisomie 12 in Mosaikform festgestellt. Bei einem Drittel der analysierten Zellen fand sich ein Karyotyp 47,XY,+12. Die Abb. 15 und 16 verdeutlichen das Ergebnis der Probe SGN 5402 PP:

4. Ergebnisse

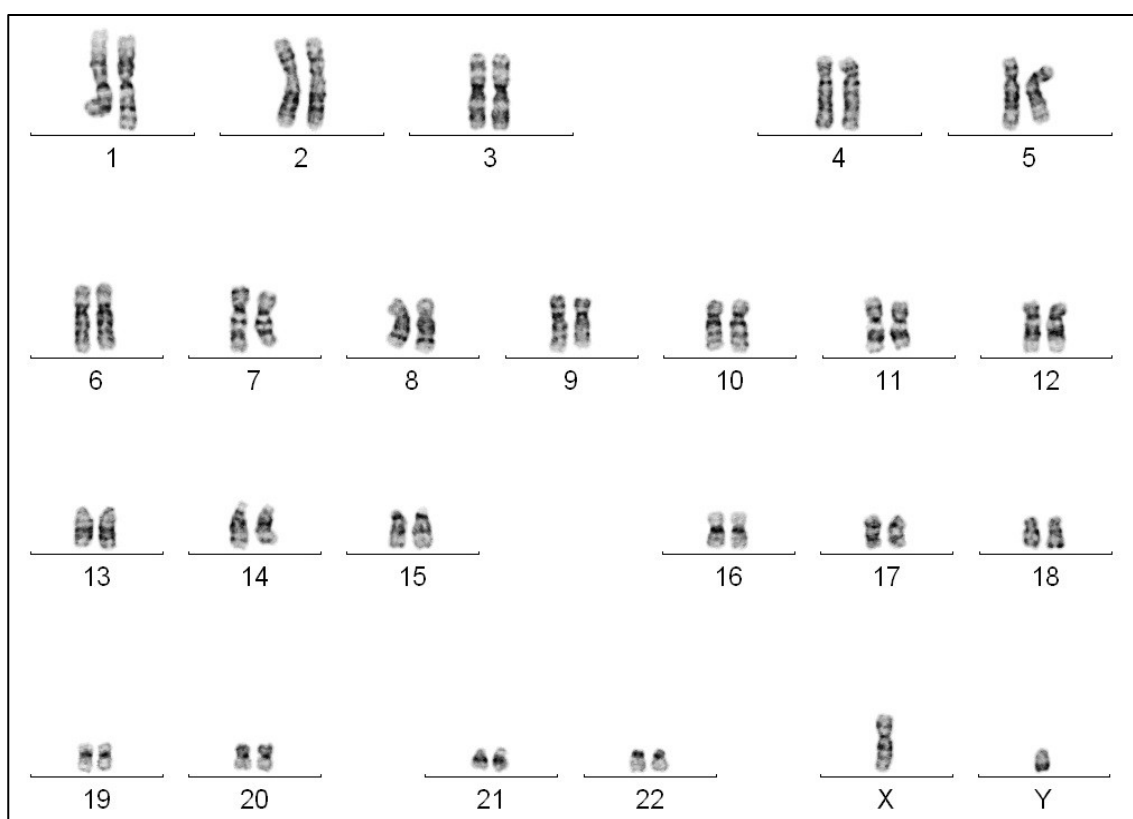


Abb. 15 Karyogramm des Patienten SGN 5402 PP: 46,XY

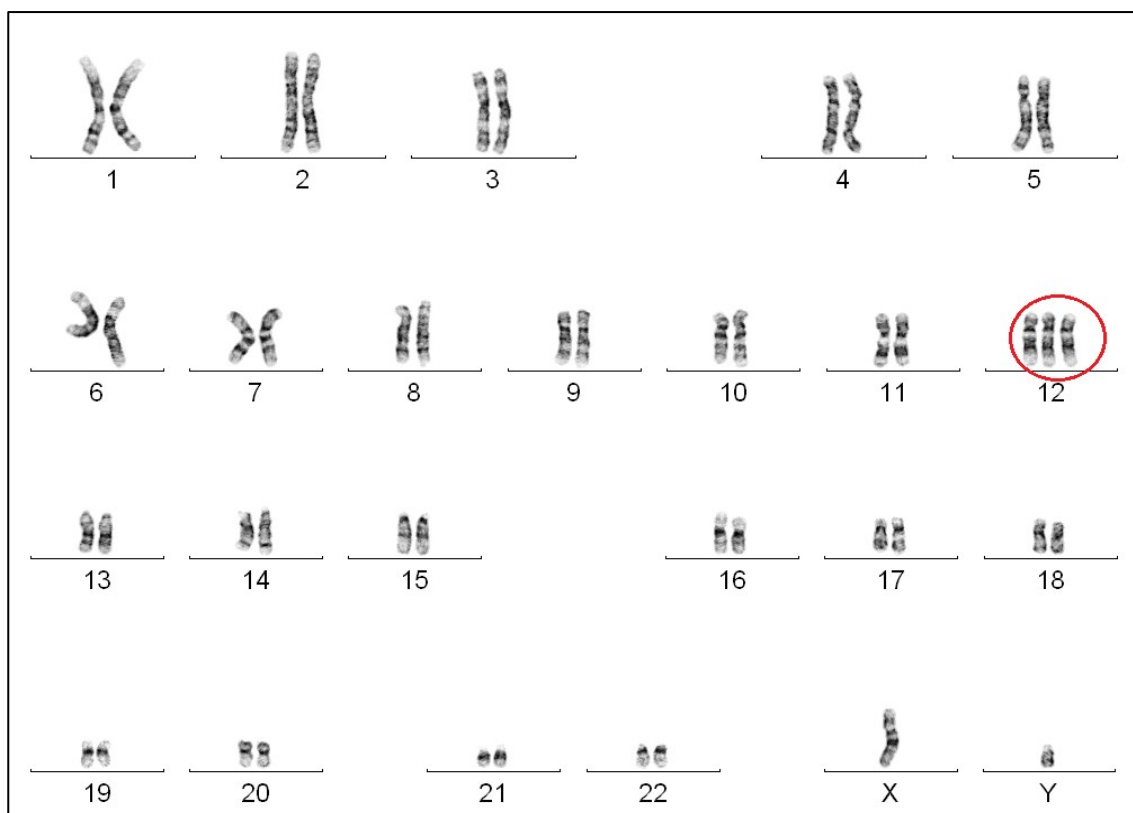


Abb. 16 Karyogramm des Patienten SGN 5402 PP: 47,XY,+12 (ein Drittel der Mitosen)

4. Ergebnisse

Zur Überprüfung des Ergebnisses wurde eine andere Charge (anderer Zellansatz) desselben Patienten ebenfalls hochgezüchtet und analysiert. In dieser zweiten Charge wurden nochmal 40 Mitosen ausgezählt, und es konnte hier keine Zelle mit einer Trisomie 12 mehr gefunden werden. Deshalb handelte es sich bei dem Erstbefund am ehesten um einen Kulturartefakt ohne gesundheitliche Bedeutung (Gardner/Sutherland, 2004).

4.2.5. Sequenzielle Chromosomenveränderungen

Der Studienteilnehmer SGN 5159 PP wies bei der Karyotypisierung von insgesamt zwölf Mitosen folgende Chromosomenveränderungen auf:

- * in zwei Mitosen die Veränderung der(2)add(2p)
- * in fünf Mitosen die Veränderung der(2)add(2p),t(3;20) und
- * in einer weiteren Mitose der(2)add(2p),t(3;20),+20

Der sequenzielle Charakter der Veränderungen (d.h. das Hinzukommen einer neuen Veränderung auf die jeweils bereits bestehende Veränderung) spricht für das Vorliegen von Kulturartefakten.

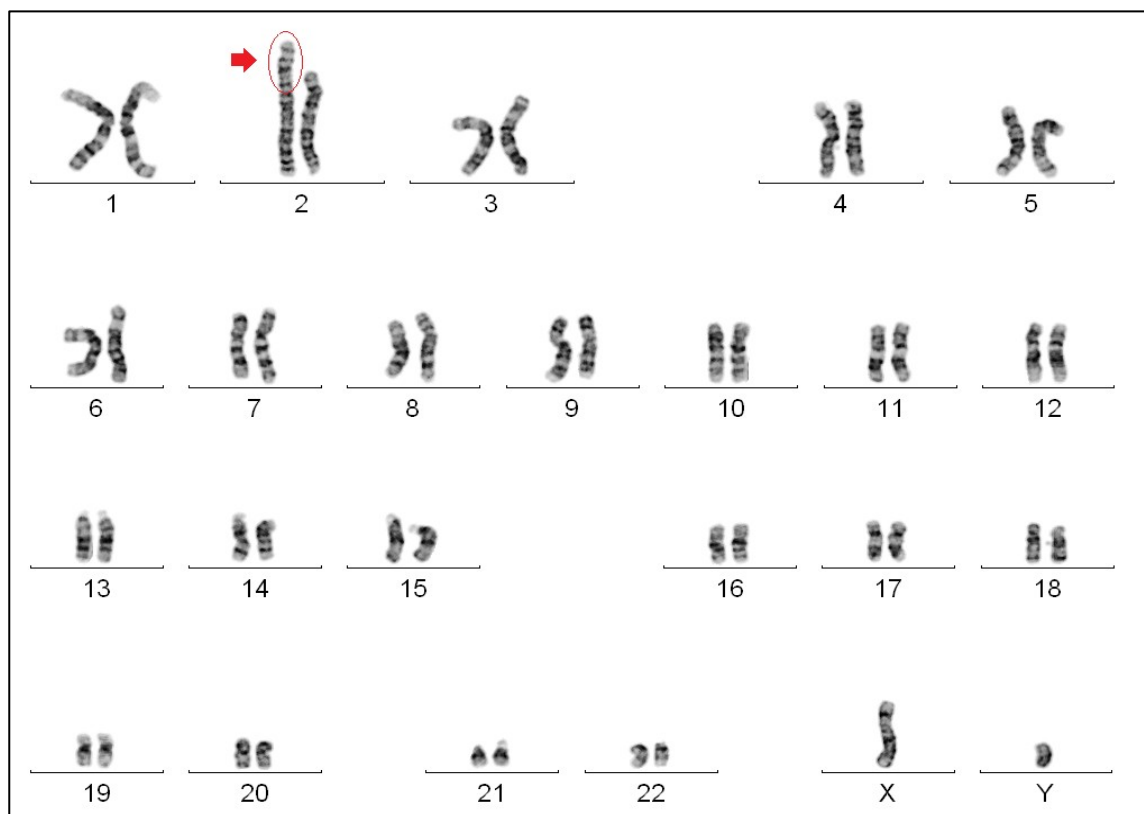


Abb. 17 Karyogramm des Patienten SGN 5159 PP: 46,XY,der(2)add(2p)

4. Ergebnisse

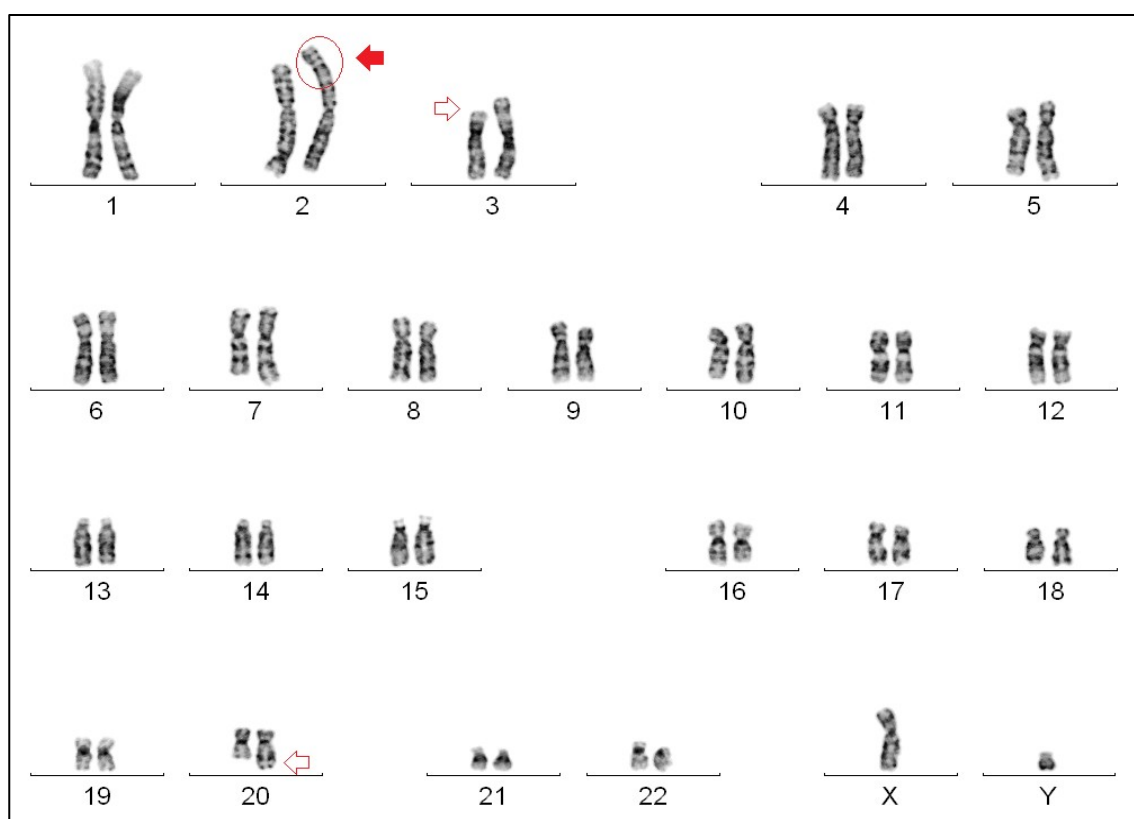


Abb. 18 Karyogramm des Patienten SGN 5159 PP: 46,XY,der(2)add(2p),t(3;20)

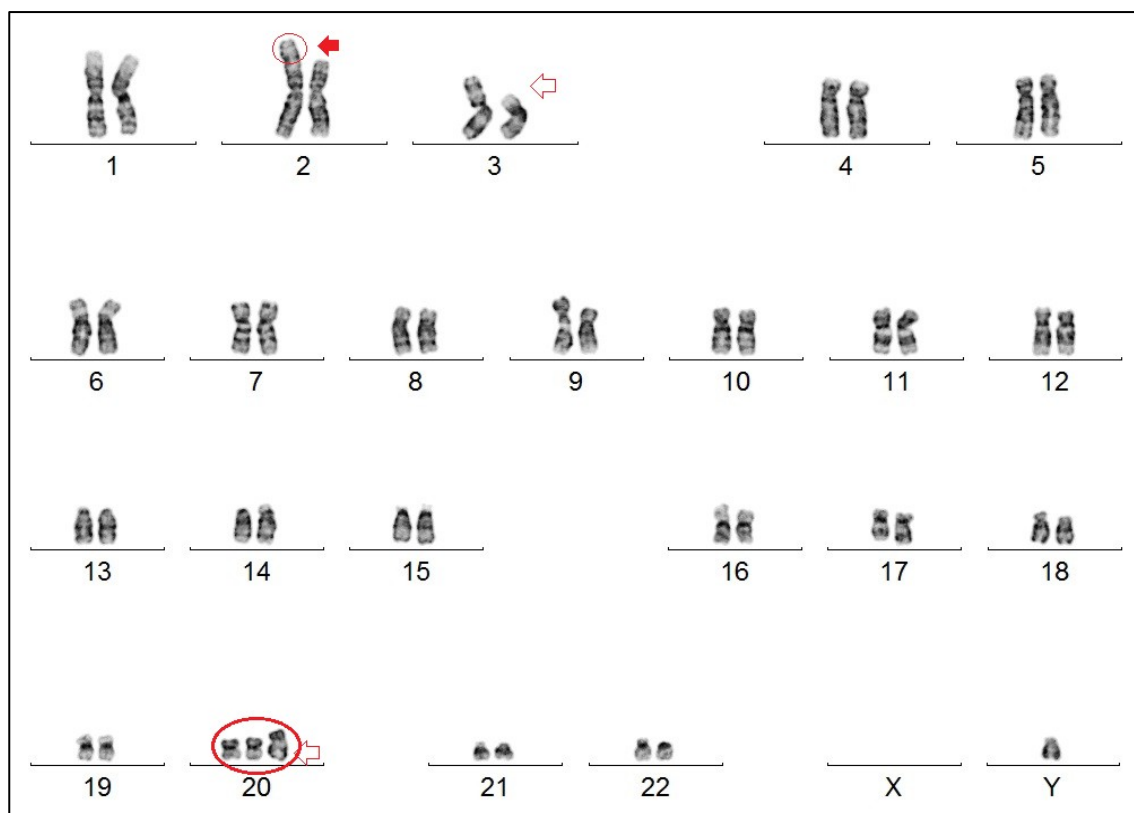


Abb. 19 Karyogramm des Patienten SGN 5159 PP: 46,X,der(2)add(2p),t(3;20),+20

4. Ergebnisse

4.2.6. Komplexe chromosomale Aberration

Beim Probanden SGN 5201 PP war eine komplexe – jeweils nicht ganz gleiche – Chromosomenaberration bei drei von zunächst 20 analysierten Mitosen auffällig, die u.a. die Chromosomen 3, 6, 11, 12, 17 und 22 miteinbezog.

Die Analyse weiterer Mitosen einer anderen Charge desselben Probanden erbrachte einen normalen, unauffälligen, weiblichen Chromosomensatz, so dass die oben beschriebenen Veränderungen auch hier nicht als verum gelten können.

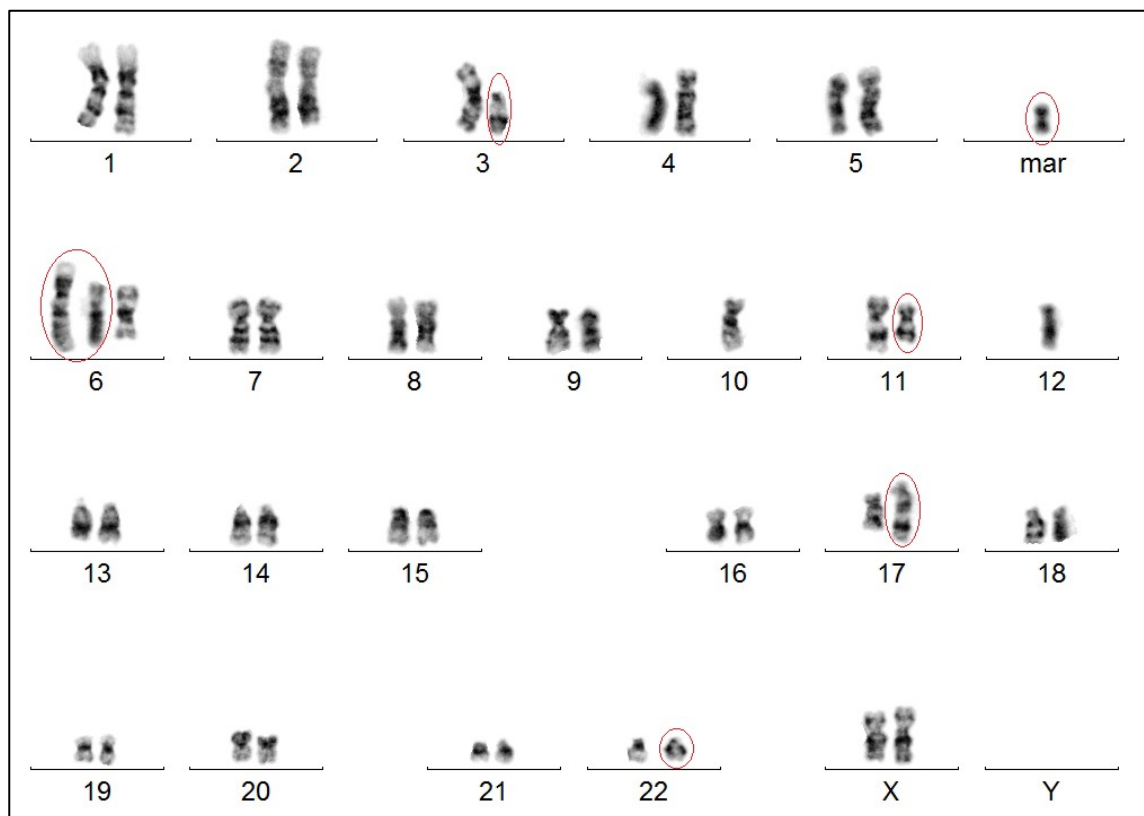


Abb. 20 Karyogramm des Patienten SGN 5201 PP: komplexe Chromosomenaberration, Bild 1

4. Ergebnisse

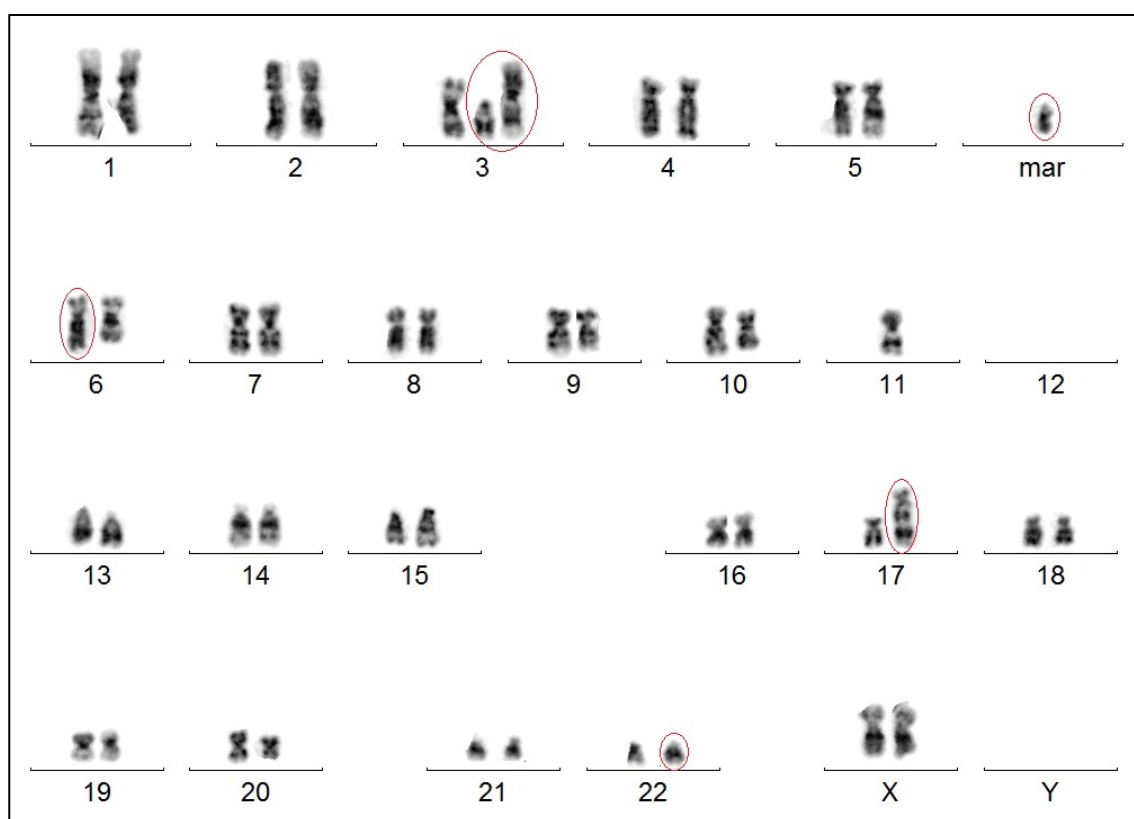


Abb. 21 Karyogramm des Patienten SGN 5201 PP: komplexe Chromosomenaberration, Bild 2

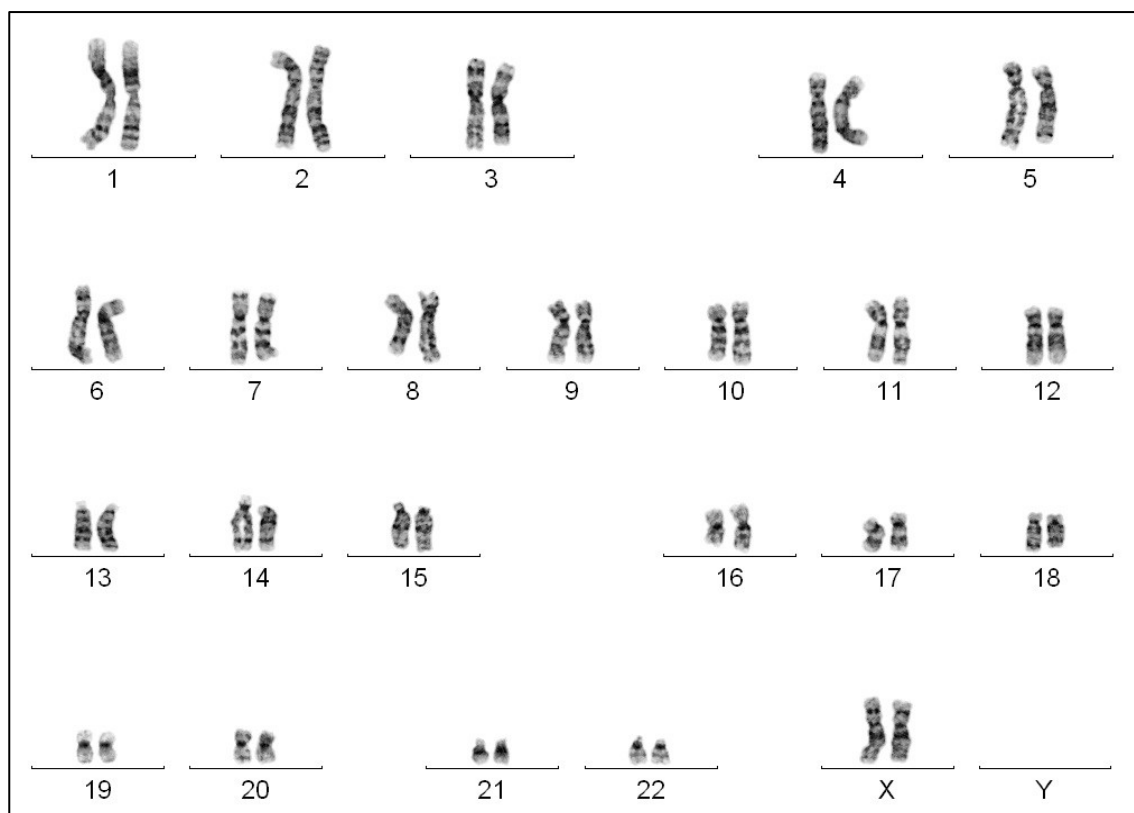


Abb. 22 Karyogramm des Patienten SGN 5201 PP, zweite Charge: unauffälliger Karyotyp 46,XX

4. Ergebnisse

4.2.7. Einzelne numerische und strukturelle Chromosomenauffälligkeiten

Die Tabelle 7 zeigt numerische und strukturelle Chromosomenauffälligkeiten, die jeweils nur in einer einzelnen Mitose des jeweiligen Probanden gefunden werden konnten und daher eher ohne Bedeutung sind, der Vollständigkeit halber hier jedoch kurz aufgeführt werden sollen:

Tabelle 7 Einzelne numerische und strukturelle Chromosomenauffälligkeiten

Probe	Auffälligkeit
SGN 5194 PP	t(5;9;16)? in einer Mitose, t(2;8;11)? in einer anderen Mitose
SGN 5201 PP	47,+12 in einer Mitose, 47,+16 in einer anderen Mitose
SGN 5199 PP	der(3) in einer Mitose
SGN 5192 PP	47,nicht zuzuordnende Veränderung in einer Mitose
A3	der(X)t(X;22) in einer Mitose
SGN 5250 PP	ace(13;?14) in einer Mitose
SGN 5264 PP	der(?X) in einer Mitose, 47,+15 in einer anderen Mitose
SGN 5375 PP	Fraglicher Marker und del(16) in einer Mitose, dic(5;15) in einer anderen Mitose
SGN 5488 PP	dic(10;12) in einer Mitose
SGN 5339 PP	del(16) in einer Mitose
SGN 5495 PP	dic(10;17)? in einer Mitose, 47,+12 in einer anderen Mitose
SGN 5391 PP	t(1;X) in einer Mitose
SGN 5377 PP	dic(9;10;17), t(10;17) in einer Mitose
SGN 5202 PP	inv(14) in einer Mitose
SGN 3009	del(16) in einer Mitose
SGN 3230	47,+22 in einer Mitose
SGN 3168	t(11;12) in einer Mitose
SGN 3232	dic(10;20), -ace(10;20) in einer Mitose
SGN 3246	t(5;8) in einer Mitose
SGN 3252	del(1) in einer Mitose

4.3. FISH

Mithilfe der FISH wurde untersucht, ob die Probanden eine Mikrodeletion 22q11.2 aufweisen.

Die FISH erfolgte anhand von Metaphase- oder Interphasechromosomen (siehe Übersichtstabelle in Kapitel 4.1.).

Von jeder Probe sollten zehn Mitosen mittels FISH analysiert werden.

Von den Proben A15 und A18 konnte kein geeignetes Material für die FISH gewonnen werden.

4.3.1. Verwendete Sonden

Für die Mikrodeletion 22q11.2-Analyse wurden die beiden Sonden „LSI TUPLE 1 Spectrum-Orange“ und „LSI ARSA SpectrumGreen“ von Abbott Molecular verwendet = „Vysis DiGeorge Region Probe“. Diese Probe wird im Institut für Humangenetik standardmäßig für die Diagnose des Mikrodeletion 22q11.2-Syndroms angewandt.

4. Ergebnisse

Die Sonde „LSI ARSA SpectrumGreen“ markiert und identifiziert mit einem grünen Fluorophor das Chromosom 22 in der Bande q13, während die Sonde „LSI TUPLE 1 SpectrumOrange“ den betroffenen Deletionsbereich (22q11.2) mit einem roten Farbstoff kennzeichnet.

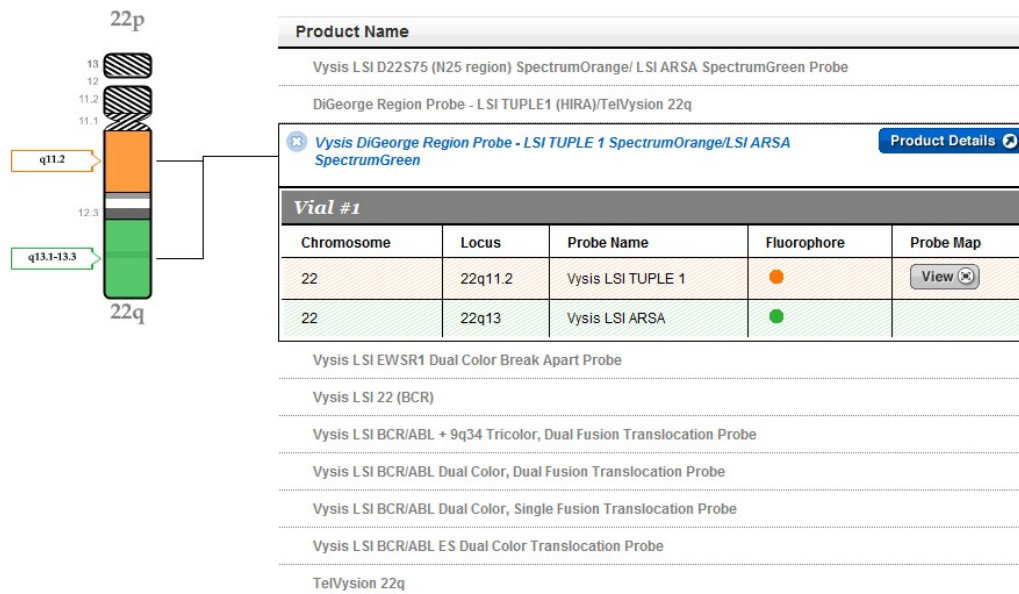


Abb. 23 Vysis DiGeorge Region Probe (<http://www.abbottmolecular.com/us/chromosome/22.html>)

Bei der Auswertung der FISH beweist das Fehlen des roten Signals bei gleichzeitigem Vorhandensein des grünen Signals am Chromosom 22 die gesuchte Mikrodeletion. Eine fehlerhafte FISH kann anhand des Fehlens beider Signalfarbstoffe (rot und grün) erkannt werden. Das Vorliegen falsch positiver Ergebnisse wird somit durch den kombinierten Einsatz der beiden Sonden verhindert.

4.3.2. Beispiel einer Mikrodeletion 22q11.2

Abb. 24 zeigt die FISH einer Person (nicht zur vorliegenden Studie gehörig) mit einer Mikrodeletion 22q11.2. Das Fehlen des zweiten Signals für die Region 22q11.2 sichert die Diagnose der Erkrankung.

4. Ergebnisse

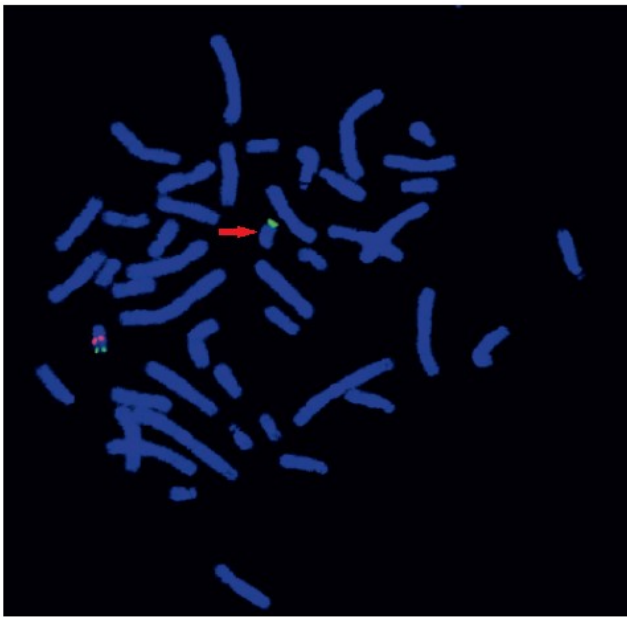


Abb. 24 Nachweis einer Mikrodeletion 22q11.2 mittels FISH (Beispiel)

Die Sonde TUPLE 1 ist rot und die Kontroll-Sonde ARSA grün markiert. (aus Sieberer et al., 2006)

4.3.3. Tatsächliches Analyseergebnis

Die FISH aller analysierten Proben dieser Arbeit war unauffällig.

Die Abb. 25, 26 und 27 zeigen drei Beispiele der unauffälligen Analyse mit jeweils zwei grünen und zwei roten Fluoreszenzsignalen. Die Interphase-FISH fand Anwendung bei Patienten, bei denen die Qualität der aufgetropften Objektträgerpräparate für eine Metaphase-FISH nicht ausreichend war.

4. Ergebnisse

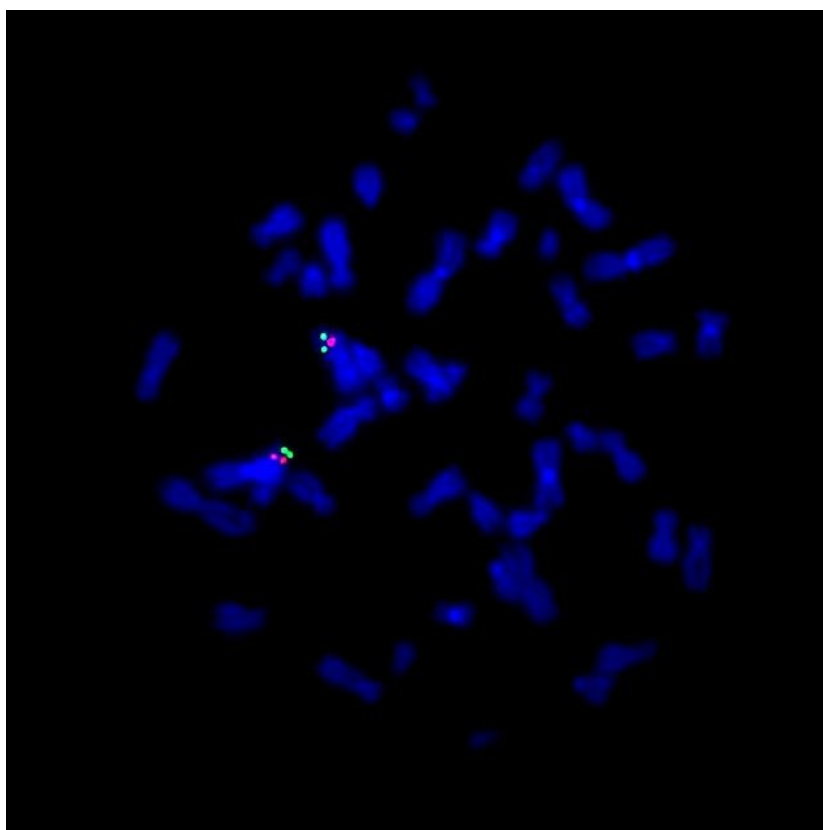


Abb. 25 Metaphase-FISH der Probe SGN 3256

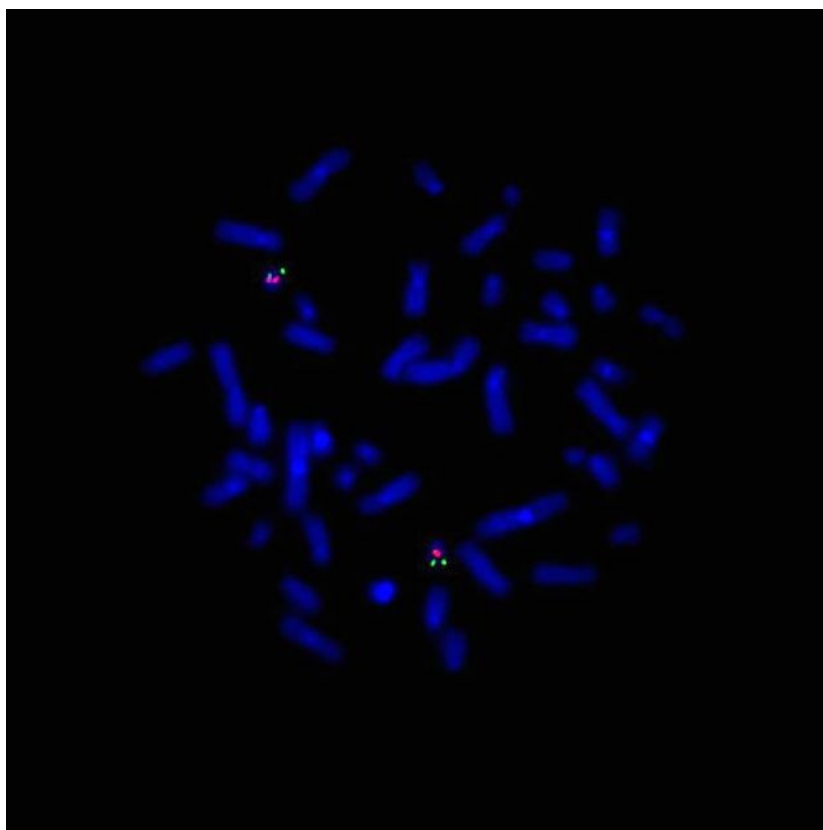


Abb. 26 Metaphase-FISH der Probe SGN 3255

4. Ergebnisse

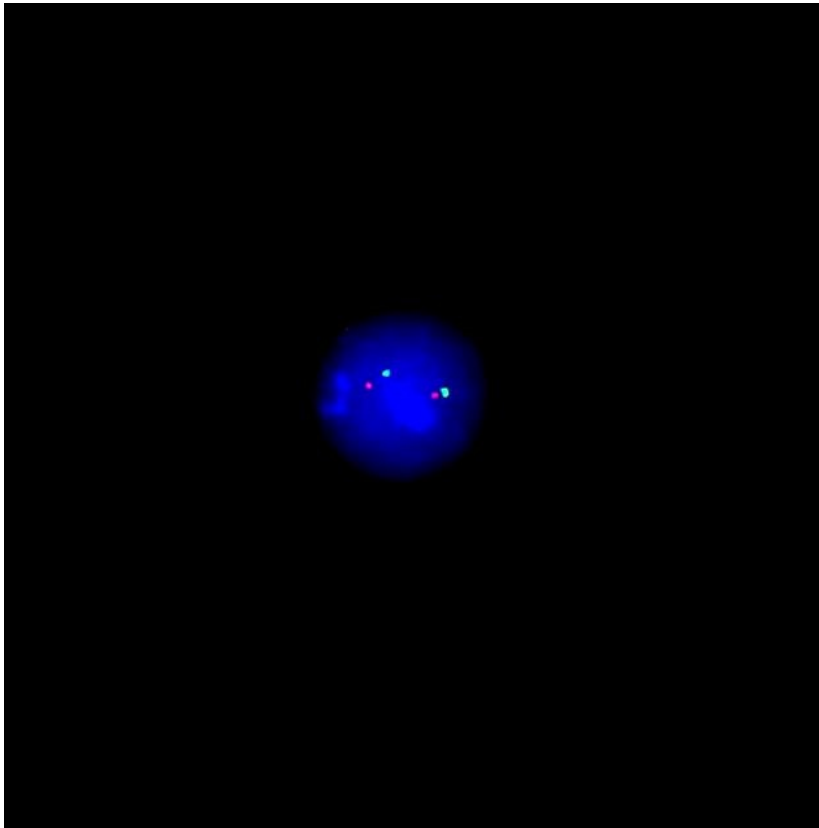


Abb. 27 Interphase-FISH der Probe SGN 3051

4.4. Genanalyse

Mithilfe der Genanalyse wurde untersucht, ob die Probanden die ADNFLE-Mutation 776ins3 im *CHRNA4*-Gen aufweisen.

Das *CHRNA4*-Gen kodiert für die $\alpha 4$ -Untereinheit des nikotinischen Azetylcholinrezeptors (nAChR), und bei der 776ins3-Mutation handelt es sich um die Insertion eines zusätzlichen Basen-tripletts GCT an Nukleotidposition 776 in Exon 5 dieses Gens (Näheres zu dieser Mutation und zur ADNFLE siehe Kapitel 1.7.4.).

4. Ergebnisse

```

5'-
TGCTGACGGGGACTTCGCGGTACCCACCTGACCAAGGCCACCTGTTCCATGACGGGCGGGTGCAGTGGACTCCCC
CGGCCATTTACAAGAGCTCCTGCAGCATCGACGTCACCTTCTTCCCTTCGACCAGCAGAACTGCACCATGAAATTC
GGCTCCTGGACCTACGACAAGGCCAAGATCGACCTGGTGAACATGCACAGCCGCGTGGACCAGCTGGACTTCTGGG
AGAGTGGCGAGTGGGTTCATCGTGGATGCCGTGGGACCTACAACACCAGGAAGTACGAGTGTGTGCCGAGATCTA
CCCGACATCACCTATGCCTTCGTCATCCGGCGGCTGCCGCTCTTCTACACCATCAACCTCATCATCCCTGCCTGCT
CATCTCCTGCCTACCGTGCTGGTCTTCTACCTGCCCTCCGAGTGTGGCGAGAAGATCACGCTGTGCATCTCCGTGCT
GCTGTCGCTACCGTCTTCTGCTGCTCATCACCGAGATCATCCCGTCCACCTCACTGGTTCATCCACTCATCGGCGA
GTACCTGCTGTTACCATGATCTTCGTCACCTGTCCATCGTCATCAGGCTTCTGCTGCTCAACGTGCACCACCGCTC
GCCACGCACGCACCATGCCACCTGGGTACGAGGGTCTTCTGGACATCGTGCCACGCTGCTCCTCATGAAGC
AGAGTGGCGAGTGGGTTCATCGTGGATGCCGTGGGACCTACAACACCAGGAAGTACGAGTGTGTGCCGAGATCTA
CCCGACATCACCTATGCCTTCGTCATCCGGCGGCTGCCGCTCTTCTACACCATCAACCTCATCATCCCTGCCTGCT
CATCTCCTGCCTACCGTGCTGGTCTTCTACCTGCCCTCCGAGTGTGGCGAGAAGATCACGCTGTGCATCTCCGTGCT
GCTGTCGCTACCGTCTTCTGCTGCTCATCACCGAGATCATCCCGTCCACCTCACTGGTTCATCCACTCATCGG
CGAGTACCTGCTGTTACCATGATCTTCGTCACCTGTCCATCGTCATCAGGCTCTCGTGCTCAACGTGCACCACCG
CTCGCCACGCACGCACCATGCCACCTGGGTACGAGGGTCTTCTGGACATCGTGCCACGCTGCTCCTCATGA
AGCGGCCGTCCGTGGTCAAGGACAATTGCCGGCGGCTCATCGAGTCCATGCATAAGATGGCCAGTGCCCGCGCTTC
TGGCCCGAGCCAGAAGGGGAGCCCCCTGCCACGAGCGGCACCCAGAGCCTGCACCCGCCCTACCGTCTTCTGTGT
CCCCCTGAGTGTGCCGCTGAGCCTGGGCTTCTGCAAGTACACCTCCGACCAGCTCCCTCCTCAGCAGCCCCCTGGAAG
CCTGGATGTGCCGGCTGAGCCTGGGCTTCTGCAAGTACACCTCCGACCAGCTCCCTCCTCAGCAGCCCCCTGGAAG
CTGAGAAAGCCAGCCCCACCCCTCGCCTGGACCCTGCCGCCCGCCCCACGGCACCCAGGCACCCAGGGCTGGCCAA
AGCCAGGTCCCTCAGCGTCCAGCACATGTCCAGCCTGGCGAAGCGGTGGAAGGCGCGCTCCGCTGCCGCTCTCGG
AGCATCCAGTACTGTGTCCCCGAGACGATGCCGCCCGGAGGCAGATGGCCAGGCTGCCGGCGCCCTGGCCTCTCG
CAACACCCACTCGGCTGAGTCCACCCCCAGACCAGCCCTTCCGTGCAAAATGCACATGCAAGAAGGAGCCCTCTT
CGGTGTCCCCGAGCGCCACGGTCAAGACCCGCAGCACCAAAGCGCCGCCCGCCACCTGCCCTGTCCGCCGCCCTG
ACCCGGCGGTGGAGGGCGTCCAGTACATTGCAGACCACCTGAAGGCCGAAGACACAGACTTCTCG
-3'

```

Abb. 28 „normale“ Basensequenz von Exon 5 des *CHRNA4*-Gens

```

5'-
TGCTGACGGGGACTTCGCGGTACCCACCTGACCAAGGCCACCTGTTCCATGACGGGCGGGTGCAGTGGACTCCCC
CGGCCATTTACAAGAGCTCCTGCAGCATCGACGTCACCTTCTTCCCTTCGACCAGCAGAACTGCACCATGAAATTC
GGCTCCTGGACCTACGACAAGGCCAAGATCGACCTGGTGAACATGCACAGCCGCGTGGACCAGCTGGACTTCTGGG
AGAGTGGCGAGTGGGTTCATCGTGGATGCCGTGGGACCTACAACACCAGGAAGTACGAGTGTGTGCCGAGATCTA
CCCGACATCACCTATGCCTTCGTCATCCGGCGGCTGCCGCTCTTCTACACCATCAACCTCATCATCCCTGCCTGCT
CATCTCCTGCCTACCGTGCTGGTCTTCTACCTGCCCTCCGAGTGTGGCGAGAAGATCACGCTGTGCATCTCCGTGCT
GCTGTCGCTACCGTCTTCTGCTGCTCATCACCGAGATCATCCCGTCCACCTCACTGGTTCATCCACTCATCGG
CGAGTACCTGCTGTTACCATGATCTTCGTCACCTGTCCATCGTCATCAGGCTCTCGTGCTCAACGTGCACCACCG
CTCGCCACGCACGCACCATGCCACCTGGGTACGAGGGTCTTCTGGACATCGTGCCACGCTGCTCCTCATGA
AGCGGCCGTCCGTGGTCAAGGACAATTGCCGGCGGCTCATCGAGTCCATGCATAAGATGGCCAGTGCCCGCGCTTC
TGGCCCGAGCCAGAAGGGGAGCCCCCTGCCACGAGCGGCACCCAGAGCCTGCACCCGCCCTACCGTCTTCTGTGT
CCCCCTGAGTGTGCCGCTGAGCCTGGGCTTCTGCAAGTACACCTCCGACCAGCTCCCTCCTCAGCAGCCCCCTGG
AAGCTGAGAAAGCCAGCCCCACCCCTCGCCTGGACCCTGCCGCCCGCCCCACGGCACCCAGGCACCCAGGGCTGGC
CAAAGCCAGGTCCCTCAGCGTCCAGCACATGTCCAGCCTGGCGAAGCGGTGGAAGGCGGCTCCGCTGCCGCTCT
CGGAGCATCCAGTACTGTGTCCCCGAGACGATGCCGCCCGGAGGCAGATGGCCAGGCTGCCGGCGCCCTGGCCTC
TCGCAACACCCACTCGGCTGAGTCCACCCCCAGACCAGCCCTTCCGTGCAAAATGCACATGCAAGAAGGAGCCCT
CTTCGGTGTCCCCGAGCGCCACGGTCAAGACCCGCAGCACCAAAGCGCCGCCCGCCACCTGCCCTGTCCGCCGCC
CTGACCCGGGCGGTGGAGGGCGTCCAGTACATTGCAGACCACCTGAAGGCCGAAGACACAGACTTCTCG
-3'

```

Abb. 29 Exon 5-Basensequenz im Falle der 776ins3-Mutation

Die Genanalyse in dieser Arbeit erfolgte unter Verwendung eines geeigneten Restriktionsenzym. Für nähere Informationen zu Restriktionsenzymen sei auch auf Kapitel 3.3.5. verwiesen.

4.4.1. Auswahl des geeigneten Restriktionsenzym

Für die Auswahl des geeigneten Restriktionsenzym mussten folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

1. Durch den Restriktionsenzymverdau muss man unterscheiden können, ob die *CHRNA4*-776ins3-Mutation beim Probanden vorliegt oder nicht, d.h. das Enzym muss die DNA im Falle einer *CHRNA4*-776ins3-Mutation anders schneiden als wenn diese Mutation nicht vorliegt (unterschiedlich viele bzw. verschieden lange DNA-Spaltstücke)
2. Der durch das Restriktionsenzym verursachte Unterschied beim Vorliegen der Mutation versus beim Nicht-Vorliegen der Mutation (siehe 1.) muss sichtbar gemacht werden können; auf Polyacrylamidgel gilt Folgendes:
 - a. Ein DNA-Spaltstück einer Länge ≤ 50 Bp ist auf dem Polyacrylamidgel nicht sicher beurteilbar
 - b. Um zwischen Mutation und Nicht-Mutation unterscheiden zu können, muss eine möglichst große Längendifferenz der Spaltstücke in beiden Fällen vorliegen; diese Längen-

4. Ergebnisse

differenz muss umso größer sein, je größer die Spaltstücke sind, muss jedoch mindestens 20 Bp betragen

- Um eine Erkennungssequenz und Schneidestelle für ein Restriktionsenzym zu schaffen, kann man sich sogenannter Mutageneseprimer (PCR und Mutageneseprimer siehe Kapitel 4.4.2.) bedienen; durch diese können einzelne Basen quasi ausgetauscht werden, wobei es z.B. aber Einschränkungen gibt, da der Primer binden können muss. So ist die Zahl der austauschbaren Basen auf max. 4 begrenzt, und die am weitesten 3' befindliche Base muss erhalten bleiben.

4.4.1.1. Entscheidung für die Restriktionsenzyme *BclI* und *SduI*

Unter Beachtung der eben beschriebenen Voraussetzungen wurde mithilfe der Internetseite von „Restrictionmapper“ (<http://www.restrictionmapper.org>) nach einem geeigneten Restriktionsenzym für die Genanalyse gesucht.

In „Restrictionmapper“ kann eine beliebige DNA-Basensequenz eingegeben werden, und man bekommt dann alle Restriktionsenzyme angezeigt, die die eingegebene Sequenz schneiden/„verdauen“. Außerdem werden auch die jeweilige DNA-Erkennungssequenz des Enzyms sowie die durch den Enzymverdau entstehenden Spaltstücke mit Anzahl und Länge angezeigt.

Das geeignete Enzym für die *CHRNA4*-Genanalyse lässt sich nun ermitteln, indem man die Exon 5-Sequenz einmal ohne und einmal mit der Insertionsmutation ins Programm eingibt, und man die Ergebnisse dann miteinander vergleicht.

Die Tabelle 8 zeigt das Ergebnis der Enzymsuche.

Im Falle des Vorhandenseins der *CHRNA4*-776ins3-Mutation ist eine der zwei Kopien des Gens intakt und die andere mutiert, d.h. es handelt sich um eine Heterozygotie.

Tabelle 8 Restriktionsenzym suche

<u>Basensequenz bzw. – austausch Exon 5; die in Ka- pitel 4.4.1. beschriebenen Voraussetzungen beachten</u>	<u>Restriktionsenzym und Länge der Spaltstücke ohne versus mit Mutation; in Klammern angegeben sind die Spaltfrag- mente, die auf dem Polyacrylamidgel nicht sichtbar sind; verwendet wurden die Primer von <i>BclI</i> aus Kapitel 4.4.2.</u>
Ohne Basenaustausch	<i>BbvI</i> : 309 Bp (+ 7 Bp) versus 312 Bp + 309 Bp (+ 7 Bp) (+ 3 Bp)
	<i>TseI</i> : 296 Bp (+ 20 Bp) versus 296 Bp (+ 23 Bp) (+ 20 Bp) (+ 3 Bp)
Base T (in den Abb. 28 und 29 grün markiert) darf als letzte Primer-Stelle nicht verändert werden	
a statt C 1 Stelle vor dem grün markierten T	<i>SfaNI</i> : 316 Bp versus 306 Bp (+ 13 Bp)
	<i>BsaBI</i> : 316 Bp versus 292 Bp (+ 27 Bp) (ein Nicht-Funktionieren des Enzyms kann hier möglicherweise übersehen werden)
	<i>BclI</i> : (22 Bp) + 294 Bp versus 316 Bp [(+ 22 Bp) + 294 Bp]

4. Ergebnisse

	(Heterozygotie)]
g statt C 1 Stelle vor dem T	SduI: 130 Bp (+ 9 Bp) + 151 Bp (+ 32 Bp) + 382 Bp versus (22 Bp) + 111 Bp (+ 9 Bp) + 151 Bp (+ 32 Bp) + 382 Bp + [130 Bp (Heterozygotie)]; hier: Verwendung der Primer aus Kapitel 4.4.2. für <i>SduI</i>
t statt C 1 Stelle vor dem T	TspDTI: 226 Bp + 76 Bp (+ 14 Bp) versus 243 Bp + 76 Bp
a statt G 2 Stellen vor dem grün markierten T	/
c statt G 2 Stellen vor dem T	BseRI: 198 Bp + 106 Bp (+ 12 Bp) versus 213 Bp + 106 Bp
t statt G 2 Stellen vor dem T	/
a statt T 3 Stellen vor dem grün markierten T	BbvI: 284 Bp (+ 32 Bp) versus 287 Bp (+ 22 Bp) (+ 10 Bp)
	TseI: 296 Bp (+ 20 Bp) versus 296 Bp (+ 23 Bp) (+ 20 Bp) (+ 3 Bp)
	PvuII: 316 Bp versus 296 Bp (+ 23 Bp) (ein Nicht-Funktionieren des Enzyms kann hier möglicherweise übersehen werden)
g statt T 3 Stellen vor dem T	BbvI: 316 Bp versus 309 Bp (+ 10 Bp)
	TseI: 316 Bp versus 296 Bp (+ 23 Bp) (ein Nicht-Funktionieren des Enzyms kann hier möglicherweise übersehen werden)
c statt T 3 Stellen vor dem T	BbvI: 316 Bp versus 309 Bp (+ 10 Bp)
	TseI: 316 Bp versus 296 Bp (+ 23 Bp) (ein Nicht-Funktionieren des Enzyms kann hier möglicherweise übersehen werden)

Die Wahl fiel auf die Restriktionsenzyme *BclI* und *SduI*. Die beiden Enzyme schneiden die DNA auch dann, wenn keine *CHRNA4-776ins3*-Mutation vorliegt, so dass ein potenzielles Nicht-Funktionieren der Enzyme nicht übersehen wird; die Unterscheidung der Spaltfragmente ohne versus mit Mutation ist bei *BclI* und *SduI* deutlicher als bei den anderen genannten Restriktionsenzymen.

4.4.1.2. Restriktionsfragmente von *BclI*

Das Restriktionsenzym *BclI* besitzt die Erkennungssequenz 5'---TGATCA---3'.

Es schneidet die DNA folgendermaßen: 5'---T | GATCA---3'.

Unter Verwendung der, in Kapitel 4.4.2. beschriebenen PCR-Primer – dies sind für das Enzym *BclI* der Vorwärtsmutageneseprimer F sowie der Rückwärtsprimer 54624 R – entstehen durch *BclI* folgende Spaltstücke:

- ohne *CHRNA4-776ins3*-Mutation: (22 Bp) + 294 Bp, wobei das Spaltstück mit den 22 Bp auf dem Polyacrylamidgel nicht sichtbar ist
- mit *CHRNA4-776ins3*-Mutation: 316 Bp; d.h. bei Vorhandensein der gesuchten Mutation verliert die Exon 5-DNA die Erkennungssequenz für das *BclI*-Enzym, und dieses kann die DNA nicht mehr schneiden;

4. Ergebnisse

berücksichtigt man die Heterozygotie, so resultieren bei einer Mutation die Spaltstücke: 316 Bp + (22 Bp) + 294 Bp

```

5'-
TGCTGACGGGGACTTCGCGGTCACCCACCTGACCAAGGCCACCTGTTCCATGACGGGCGGGTGCAGTGGACTCCCC
CGGCCATTTACAAGAGCTCCTGCAGCATCGACGTCACCTTCTTCCCTTCGACCAGCAGAACTGCACCATGAAATTC
GGCTCCTGGACCTACGACAAGGCCAAGATCGACCTGGTGAACATGCACAGCCGCGTGGACCAGCTGGACTTCTGGG
AGAGTGGCGAGTGGGTATCGTGGATGCCGTGGGCACCTACAACACCAGGAAGTACGAGTGTGTGCCGAGATCTA
CCCGACATCACCTATGCCTTCGTCATCCGGCGGCTGCCGCTCTTCTACACCATCAACCTCATCATCCCCTGCCTGCT
CATCTCCTGCCTACCGTGTGGTCTTCTACCTGCCCTCCGAGTGTGGCGAGAAGATCACGCTGTGCATCTCCGTGCT
GCTGTCGCTCACCCTCTCTCTGCTTTGCTCATCACCGAGATCATCCCGTCCACCTCACTGGTCACTCCCACTCATCGGCGA
GTACCTGCTGTTACCATGATCTTCGTCACCTGTCCATCGTCATCACGGTCTTCGTGCTCAACGTGCACCCACCGGTC
GCCACGCACGCACACCATGCCACCTGGGTACGCAGGGTCTTCTGGACATCGTGCCACGCTGCTCCTCATGAAGC
GGCCGTCCGTGGTCAAGGACAATTGCCGGCGGCTCATCGAGTCCATGCATAAGATGGCCAGTGCCCCGCGCTTCTGG
CCCCGAGCCAGAAGGGGAGCCCCCTGCCACGAGCGGCACCCAGAGCCTGCACCCGCCCTCACCGTCTTCTGTGTCCC
CCTGGATGCTGCGGCTGAGCCTGGGCCTTCTGCAAGTACACCTCCGACCAGCTCCCTCCTCAGCAGCCCCCTGGAAG
CTGAGAAAGCCAGCCCCACCCCTCGCCTGGACCCTGCCGCCCGCCCCACGGCACCCAGGCACCCAGGGCTGGCCAA
AGCCAGGTCCCTCAGCGTCCAGCACATGTCCAGCCCTGGCGAAGCGGTGGAAGGCGGCGTCCGGTGCCGGTCTCGG
AGCATCCAGTACTGTGTCCCCGAGACGATGCCGCCCGGAGGCAGATGGCCAGGCTGCCGGCGCCCTGGCCTCTCG
CAACACCCACTCGGCTGAGCTCCACCCCCAGCCAGCCTCTCCGTGCAAAATGCACATGCAAGAAGGAGCCCTTT
CGGTGTCCCCGAGCGCCACGGTCAAGACCCGCAGCACCAAAGCGCCGCCCGCCGACCTGCCCTGTGCCGGCCCTG
ACCCGGGCGGTGGAGGGCGTCCAGTACATTGCAGACCACCTGAAGGCCGAAGACACAGACTTCTCG
-3'

```

Abb. 30 Enzym BclI: DNA-Spaltstücke ohne CHRNA4-776ins3-Mutation

Die Primer sind unterstrichen und die klein geschriebene Base markiert den Basenaustausch

```

5'-
TGCTGACGGGGACTTCGCGGTCACCCACCTGACCAAGGCCACCTGTTCCATGACGGGCGGGTGCAGTGGACTCCCC
CGGCCATTTACAAGAGCTCCTGCAGCATCGACGTCACCTTCTTCCCTTCGACCAGCAGAACTGCACCATGAAATTC
GGCTCCTGGACCTACGACAAGGCCAAGATCGACCTGGTGAACATGCACAGCCGCGTGGACCAGCTGGACTTCTGGG
AGAGTGGCGAGTGGGTATCGTGGATGCCGTGGGCACCTACAACACCAGGAAGTACGAGTGTGTGCCGAGATCTA
CCCGACATCACCTATGCCTTCGTCATCCGGCGGCTGCCGCTCTTCTACACCATCAACCTCATCATCCCCTGCCTGCT
CATCTCCTGCCTACCGTGTGGTCTTCTACCTGCCCTCCGAGTGTGGCGAGAAGATCACGCTGTGCATCTCCGTGCT
GCTGTCGCTCACCCTCTCTCTGCTGCTTGCTCATCACCGAGATCATCCCGTCCACCTCACTGGTCACTCCCACTCATCGGC
GAGTACCTGCTGTTACCATGATCTTCGTCACCTGTCCATCGTCATCACGGTCTTCGTGCTCAACGTGCACCCACCGC
TCGCCACGCACGCACACCATGCCACCTGGGTACGCAGGGTCTTCTGGACATCGTGCCACGCTGCTCCTCATGAA
GCGGCCGTCCGTGGTCAAGGACAATTGCCGGCGGCTCATCGAGTCCATGCATAAGATGGCCAGTGCCCCGCGCTTCT
GGCCCCGAGCCAGAAGGGGAGCCCCCTGCCACGAGCGGCACCCAGAGCCTGCACCCGCCCTCACCGTCTTCTGTGTG
CCCCTGGATGTGCCGGCTGAGCCTGGGCCTTCTGCAAGTACACCTCCGACCAGCTCCCTCCTCAGCAGCCCCCTGGA
AGCTGAGAAAGCCAGCCCCACCCCTCGCCTGGACCCTGCCGCCCGCCCCACGGCACCCAGGCACCCAGGGCTGGCC
AAAGCCAGGTCCCTCAGCGTCCAGCACATGTCCAGCCCTGGCGAAGCGGTGGAAGGCGGCGTCCGGTGCCGGTCTC
GGAGCATCCAGTACTGTGTCCCCGAGACGATGCCGCCCGGAGGCAGATGGCCAGGCTGCCGGCGCCCTGGCCTCT
CGCAACACCCACTCGGCTGAGCTCCACCCCCAGACCAGCCCTTCCGTGCAAAATGCACATGCAAGAAGGAGCCCTC
TTCGGTGTCCCCGAGCGCCACGGTCAAGACCCGCAGCACCAAAGCGCCGCCCGCCGACCTGCCCTGTGCCGGCCCT
TGACCCGGGCGGTGGAGGGCGTCCAGTACATTGCAGACCACCTGAAGGCCGAAGACACAGACTTCTCG
-3'

```

Abb. 31 Enzym BclI: DNA-„Spaltstück“ mit CHRNA4-776ins3-Mutation

4.4.1.3. Restriktionsfragmente von SduI

Das Restriktionsenzym *SduI* besitzt die Erkennungssequenz 5'---GNGCNC---3'.

Es schneidet an dieser Position: 5'---GNGCN | C---3'.

Unter Verwendung der PCR-Primer Fn (ein Mutageneseprimer) und CHRNA4 Seq3 R (siehe auch Kapitel 4.4.2.) entstehen durch *SduI* folgende Spaltstücke:

- ohne CHRNA4-776ins3-Mutation: 130 Bp + (9 Bp) + 151 Bp + (32 Bp) + 382 Bp, wobei das Spaltstück mit 9 Bp und das mit 32 Bp auf dem Polyacrylamidgel nicht sichtbar sind
- mit CHRNA4-776ins3-Mutation: (22 Bp) + 111 Bp + (9 Bp) + 151 Bp + (32 Bp) + 382 Bp bzw. mit Heterozygotie: (22 Bp) + 111 Bp + (9 Bp) + 151 Bp + (32 Bp) + 382 Bp + 130 Bp (die eingeklammerten Spaltstücke auch hier auf dem Gel nicht sichtbar);

4. Ergebnisse

anders als bei *BclI* entsteht hier durch die Mutation eine zusätzliche Schneidestelle für das Restriktionsenzym *SduI*



Abb. 32 Enzym *SduI*: DNA-Spaltstücke ohne *CHRNA4-776ins3*-Mutation

Die Primer sind unterstrichen und die klein geschriebene Base markiert den Basenaustausch



Abb. 33 Enzym *SduI*: DNA-Spaltstücke mit *CHRNA4-776ins3*-Mutation

4.4.1.4. *BclI* als erste Wahl

Unter Verwendung von Testproben und Mutationsprobe (siehe Kapitel 2.) wurden die Ergebnisse des Enzymverbaus von *BclI* und *SduI* miteinander verglichen:

4. Ergebnisse

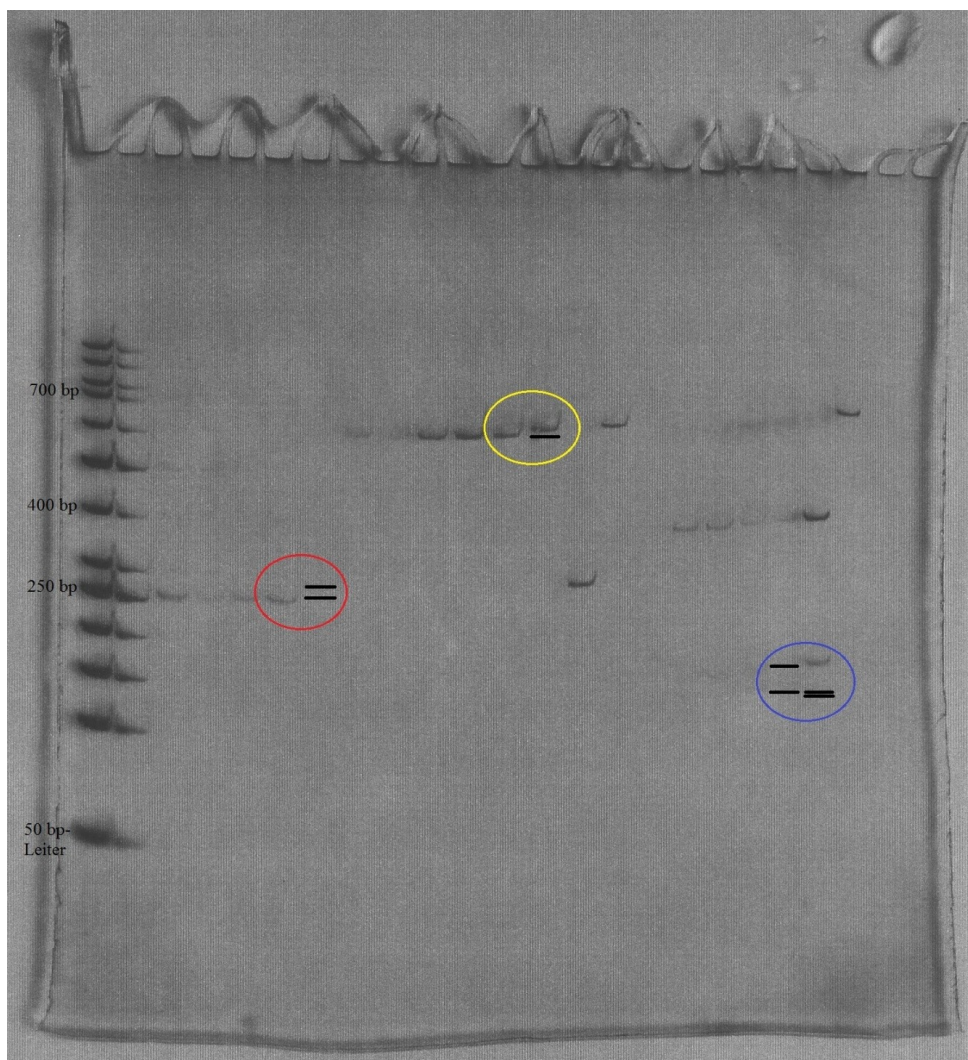


Abb. 34 Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der Test-Genanalyse

Eingekreist sieht man das Ergebnis der jeweiligen Analyse mit der unauffälligen DNA-Probe links und der Vergleichs-Mutationsprobe M rechts im Kreis; das Ergebnis ist teils nachgezeichnet, damit man es auf der Fotografie besser erkennt

- roter Kreis: Verwendung des Restriktionsenzym *BclI* sowie der Primer F und 54624 R (Länge der Spaltfragmente: 294 Bp (+ 22 Bp) versus 316 Bp + 294 Bp (+ 22 Bp))
- gelber Kreis: *BclI*, Primer F und *CHRNA4* Seq3 R (687 Bp (+ 22 Bp) versus 709 Bp + 687 Bp (+ 22 Bp))
- blauer Kreis: *SduI*, Primer Fn und *CHRNA4* Seq3 R (382 Bp + 151 Bp + 130 Bp (+ 32 Bp + 9 Bp) versus 382 Bp + 151 Bp + 111 Bp (+ 32 Bp + 22 Bp + 9 Bp) + 130 Bp)

Mithilfe des Enzyms *BclI* war der Unterschied zwischen Mutation versus keine Mutation besser zu erkennen als mithilfe von *SduI*.

Ein Problem im Zusammenhang mit dem Restriktionsenzym *BclI* würde jedoch sein, dass bei einem Nicht-Schneiden des Enzyms nicht zwischen dem Vorliegen der gesuchten Mutation und einem fehlerhaften Enzymverdau/Partialverdau unterschieden werden können.

Das Schaffen einer zweiten *BclI*-Schneidestelle in Exon 5 des *CHRNA4*-Gens zur Kontrolle scheiterte in der Durchführung aufgrund des hierfür nötigen Rückwärtsmutageneseprimers mit zwei ausgetauschten DNA-Basen, die gewünschten PCR-Produkte wurden nicht erzielt:

4. Ergebnisse

5'-
 TGCTGACGGGGACTTCGCGGTACCCACCTGACCAAGGCCACCTGTTCCATGACGGGCGGGTGCAGTGGACTCCCC
 CGGCCATTTACAAGAGCTCCTGCAGCATCGACGTACCTTCTTCCCCTTCGACCAGCAGAACTGCACCATGAAATTC
 GGCTCCTGGACCTACGACAAGGCCAAGATCGACCTGGTGAACATGCACAGCCGCGTGGACCAGCTGGACTTCTGGG
 AGAGTGGCGAGTGGGTTCATCGTGGATGCCGTGGGACCTACAACACCAGGAAGTACGAGTGTCTGCGGAGATCTA
 CCCGACATCACCTATGCCTTCGTCATCCGGCGGTGCCGTCTTCTACACCATCAACCTCATCATCCCCTGCCTGCT
 CATCTCTGCCTACCGTGCTGGTCTTCTACCTGCCCTCCGAGTGTGGCGAGAAGATCACGCTGTGCATCTCCGTGCT
 GCTGTCGCTCACCCTCTCCTGCTG^TG^ATCA^TTCACCGAGATCATCCCCTCCACCTCACTGGTCATCCCACTCATCGGCGA
 GTACCTGCTGTTACCATGATCTTCGTCACCCTGTCCATCGTCATCACGGTCTTCGTGCTCAACGTGCACCACCGCTC
 GCCACGCACGCACACCATGCCACCTGGGTACGCAGGGTCTTCTGGACATCGTCCACGCCTGCTCCTCATGAAGC
 GGCGTCCGTGGTCAAGGACAATTGCCGGCGGC^Tg^ATC^aAGTCCATGCATAAGATGG^CCAAGTGCCCCGCGCTTCTGG
 CCCGAGCCAGAAGGGGAGCCCCCTGCCACGAGCGGCACCCAGAGCCTGCACCCGCCCTCACCCTCCTTCTGTGTCC
 CCTGGATGTGCCGGCTGAGCCTGGGCCTTCTGCAAGTACCCTCCGACCAGCTCCCTCCTCAGCAGCCCCCTGGAAG
 CTGAGAAAGCCAGCCCCCACCCTCGCCTGGACCCTGCCGCCCGCCCCACGGCACCCAGGCACCAGGGCTGGCCAA
 AGCCAGGTCCCTCAGCGTCCAGCACATGTCCAGCCCTGGCGAAGCGGTGGAAGGCGGCGTCCGGTGCCGGTCTCGG
 AGCATCCAGTACTGTGTTCCTCCGAGACGATGCCGCCCGGAGGCAGATGGCCAGGCTGCCGCGGCCCTGGCCTCTCG
 CAACACCCACTCGGCTGAGTCTCCACCCCCAGACCAGCCCTCTCCGTGCAAATGCACATGCAAGAAGGAGCCCTCTT
 CGGTGTCCCCGAGCGCCACGGTCAAGACCCGACGACCAAAGCGCCGCCCGCACCTGCCCTGTGCGCCGCCCTG
 ACCCGGCGGTGGAGGGCGTCCAGTACATTGCAGACCACCTGAAGGCCGAAGACACAGACTTCTCG
 -3'

Abb. 35 Enzym *BclI* mit einer zusätzlich geschaffenen Kontroll-Schneidestelle: DNA-Spaltstücke ohne *CHRNA4-776ins3-Mutation*

Die Primer sind unterstrichen und die klein geschriebenen Basen markieren den Basenaustausch

5'-
 TGCTGACGGGGACTTCGCGGTACCCACCTGACCAAGGCCACCTGTTCCATGACGGGCGGGTGCAGTGGACTCCCC
 CGGCCATTTACAAGAGCTCCTGCAGCATCGACGTACCTTCTTCCCCTTCGACCAGCAGAACTGCACCATGAAATTC
 GGCTCCTGGACCTACGACAAGGCCAAGATCGACCTGGTGAACATGCACAGCCGCGTGGACCAGCTGGACTTCTGGG
 AGAGTGGCGAGTGGGTTCATCGTGGATGCCGTGGGACCTACAACACCAGGAAGTACGAGTGTCTGCGGAGATCTA
 CCCGACATCACCTATGCCTTCGTCATCCGGCGGTGCCGTCTTCTACACCATCAACCTCATCATCCCCTGCCTGCT
 CATCTCTGCCTACCGTGCTGGTCTTCTACCTGCCCTCCGAGTGTGGCGAGAAGATCACGCTGTGCATCTCCGTGCT
 GCTGTCGCTCACCCTCTCCTGCTG^aTGCT^aCATCACCGAGATCATCCCCTCCACCTCACTGGTCATCCCACTCATCGGC
 GAGTACCTGCTGTTACCATGATCTTCGTCACCCTGTCCATCGTCATCACGGTCTTCGTGCTCAACGTGCACCACCGC
 TCGCACGCACGCACACCATGCCACCTGGGTACGCAGGGTCTTCTGGACATCGTCCACGCCTGCTCCTCATGAA
 GCGGCCGTCCGTGGTCAAGGACAATTGCCGGCGGC^Tg^ATC^aAGTCCATGCATAAGATGG^CCAAGTGCCCCGCGCTTCT
 GGCCCCGAGCCAGAAGGGGAGCCCCCTGCCACGAGCGGCACCCAGAGCCTGCACCCGCCCTCACCCTCCTTCTGTGTC
 CCCCTGGATGTGCCGGCTGAGCCTGGGCCTTCTGCAAGTACCCTCCGACCAGCTCCCTCCTCAGCAGCCCCCTGGA
 AGCTGAGAAAGCCAGCCCCCACCCTCGCCTGGACCCTGCCGCCCGCCCCACGGCACCCAGGCACCAGGGCTGGCC
 AAAGCCAGGTCCCTCAGCGTCCAGCACATGTCCAGCCCTGGCGAAGCGGTGGAAGGCGGCGTCCGGTGCCGGTCTC
 GGAGCATCCAGTACTGTGTTCCTCCGAGACGATGCCGCCCGGAGGCAGATGGCCAGGCTGCCGGCGCCCTGGCCTCT
 CGAACACCCACTCGGCTGAGTCTCCACCCCCAGACCAGCCCTCTCCGTGCAAATGCACATGCAAGAAGGAGCCCTC
 TTCGGTGTCCCCGAGCGCCACGGTCAAGACCCGACGACCAAAGCGCCGCCCGCACCTGCCCTGTGCGCCGCCCTG
 TACCCGGGCGGTGGAGGGCGTCCAGTACATTGCAGACCACCTGAAGGCCGAAGACACAGACTTCTCG
 -3'

Abb. 36 Enzym *BclI* mit einer zusätzlich geschaffenen Kontroll-Schneidestelle: DNA-Spaltstücke mit *CHRNA4-776ins3-Mutation*

Somit wurde folgendes Vorgehen gewählt:

1. Restriktionsenzymverdau mit *BclI*
2. bei Unklarheiten bezüglich des Ergebnisses: Restriktionsenzymverdau mit *SduI* und
3. zur endgültigen Bestätigung bei hochgradigem Verdacht auf eine *CHRNA4-776ins3-Mutation*: Sequenzierung der DNA

4.4.2. PCR-(Mutagenese-)Primer

Durch einen sogenannten Mutageneseprimer kann in der Ursprungs-DNA gezielt der Austausch einer oder mehrerer DNA-Basen herbeigeführt werden, um so eine bestimmte DNA-Erkennungssequenz für ein zu verwendendes Restriktionsenzym zu schaffen. Dabei dürfen jedoch nicht mehrere, eng oder direkt nebeneinander liegende DNA-Basen verändert werden, da der Primer sonst nicht mehr richtig und fest genug binden kann.

4. Ergebnisse

Unter Zuhilfenahme des Computerprogramms „Primer3“ (z.B. „http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi“) wurden folgende Primer für die PCR bestimmt:

Für das Restriktionsenzym *BclI*:

- * Vorwärtsprimer F: 5'---T-G-T-C-G-C-T-C-A-C-C-G-T-C-T-T-C-C-T-G-C-T-G-a-T---3'; bei diesem Primer handelt es sich um einen Mutageneseprimer, der zum Austausch der Base „C“ gegen die Base „a“ führt und somit die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *BclI* schafft (Schmelztemperatur $T_M = 66.3\text{ °C}$)
- * Rückwärtsprimer 54624 R: 5'---G-G-C-T-C-G-G-G-C-C-A-G-A-A-G-C-G-C-G-G---3' (Schmelztemperatur $T_M = 69.6\text{ °C}$)
- * Rückwärtsprimer R bei zusätzlicher Kontroll-Schneidestelle: 5'---C-C-A-T-C-T-T-A-T-G-C-A-T-G-G-A-C-T-t-G-A-T-c-A-G-C---3'; bei diesem Primer handelt es sich um einen Mutageneseprimer, der zum Austausch zweier Basen – „C“ gegen „t“ und „G“ gegen „c“ – führt (Schmelztemperatur $T_M = 63.2\text{ °C}$)

Für das Restriktionsenzym *SduI*:

- * Vorwärtsprimer Fn: 5'---T-C-A-C-C-G-T-C-T-T-C-C-T-G-C-T-G-g-T---3'; auch hier handelt es sich um einen Mutageneseprimer (Austausch von „C“ gegen „g“; Schmelztemperatur $T_M = 58.8\text{ °C}$)
- * Rückwärtsprimer CHRNA4 Seq3 R: 5'---C-T-C-A-G-C-C-G-A-G-T-G-G-G-T-G-T-T---3' (Schmelztemperatur T_M nach der sogenannten Wallace-Regel [$TM = 2 * (A + T) + 4 * (G + C)$]= 58 °C)

4.4.3. Überprüfen des PCR-Ergebnisses auf Agarosegel

Vor jedem Restriktionsenzymverdau wurde überprüft, ob die vorausgehende PCR erfolgreich war oder nicht. Dazu wurden die fertigen PCR-Produkte auf 1%-iges Agarosegel aufgetragen.

4.4.3.1. Beispiel für eine nicht gelungene PCR

Abb. 37 zeigt ein Beispiel für eine nicht-gelungene PCR: hier sieht man, dass die verwendeten Primer allem Anschein nach zu unspezifisch gebunden haben, da multiple PCR-Produkte entstanden sind, von welchen keines die gewünschte Größe hatte.

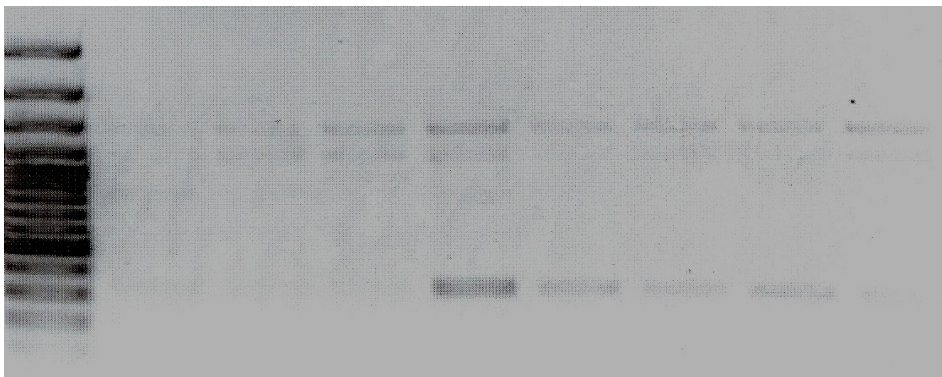


Abb. 37 Beispiel für eine nicht-gelungene PCR, Agarosegel

Unspezifische Primerbindung (*BclI*, Primer F und 54624 R, Touchdown-PCR ab 62 °C und 1-minütige 72 °C -Schritte)

4. Ergebnisse

4.4.3.2. Beispiel für eine gelungene PCR

In Abb. 38 ist das Ergebnis einer erfolgreichen PCR dargestellt. Diese ist der Ausgangspunkt für den Restriktionsenzymverdau. Man sieht die einheitlichen PCR-Produkte in der erwarteten und gewünschten Größe:

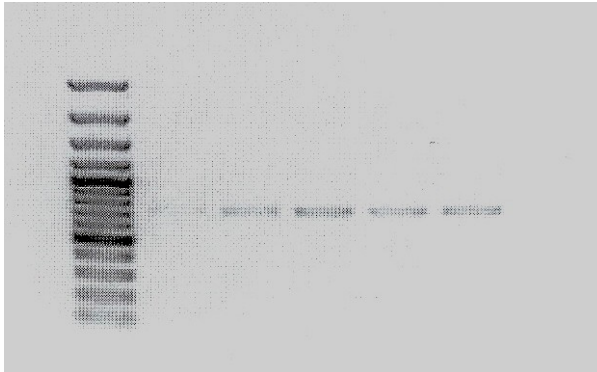


Abb. 38 Beispiel für eine gelungene PCR, Agarosegel
(*Bcl*I, Soll-Länge 709 Bp, Primer F und *CHRNA4* Seq3 R, Touchdown-PCR ab 63 °C)

4.4.4. Ergebnis der *CHRNA4*-776ins3-Genanalyse, entstandene silbergefärbte Polyacrylamidgele

Wie die folgenden Abbildungen zeigen, konnte bei keinem der Probanden die gesuchte *CHRNA4*-776ins3-Mutation gefunden werden.

Der Unterschied zwischen Mutation versus keine Mutation ist jeweils deutlich zu erkennen (zur Positivkontrolle „M“ siehe Kapitel 2.4.):

4. Ergebnisse

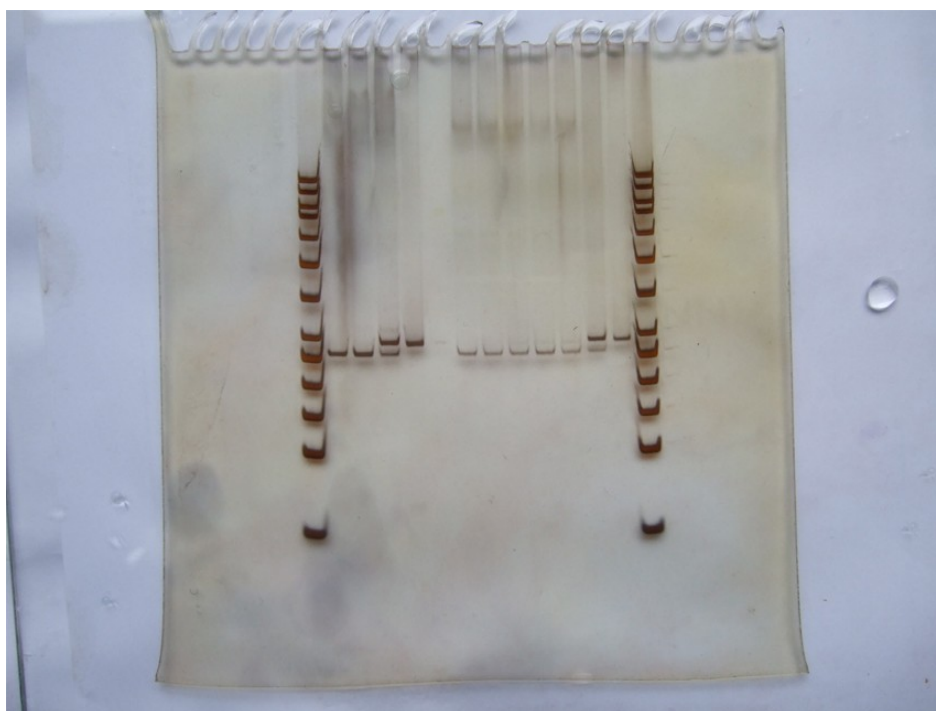


Abb. 39 Silbergefärbtes Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der Genanalyse, Bild 1

Bandenreihenfolge: 50 Bp-Leiter - SGN 3169 - SGN 3230 - Mutationsprobe M - SGN 3169 unverdaut – Leer - SGN 3260 - SGN 5150 PP - SGN 5202 PP - SGN 5299 PP - SGN 5383 PP – M - SGN 3260 unverdaut - 50 Bp-Leiter

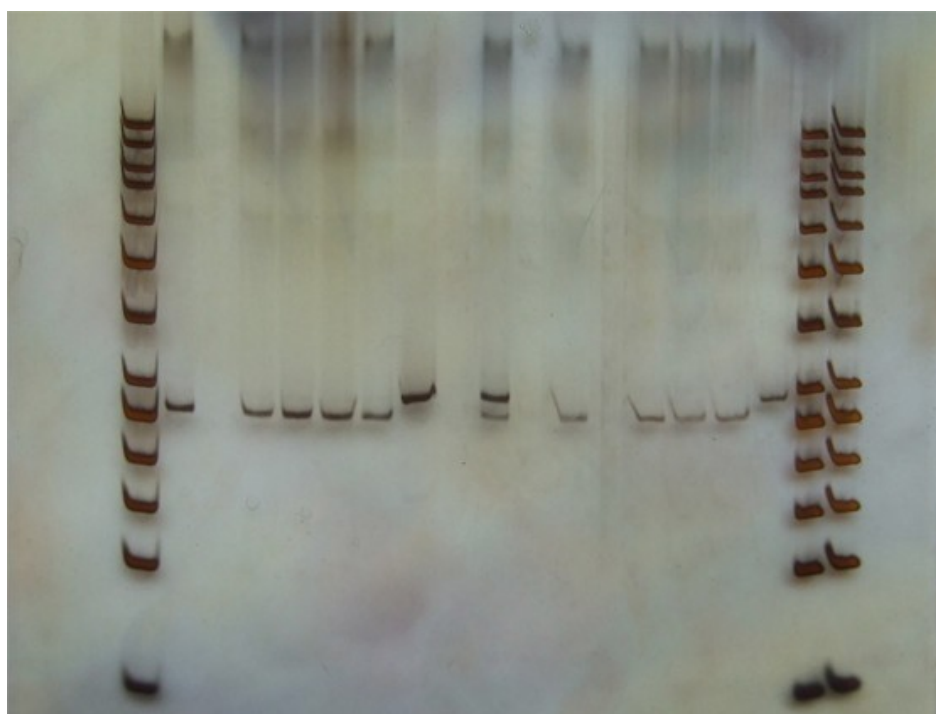


Abb. 40 Silbergefärbtes Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der Genanalyse, Bild 2

Bandenreihenfolge: 50 Bp-Leiter - SGN 3022 – Leer - SGN 3057 - SGN 3160 - SGN 3217 - SGN 3252 - SGN 3022 unverdaut – Leer - Mutationsprobe M – Leer - SGN 5094 PP – Leer - SGN 5194 PP - SGN 5251 PP - SGN 5345 PP - SGN 5094 PP unverdaut - 50 Bp-Leiter - 50 Bp-Leiter

4. Ergebnisse

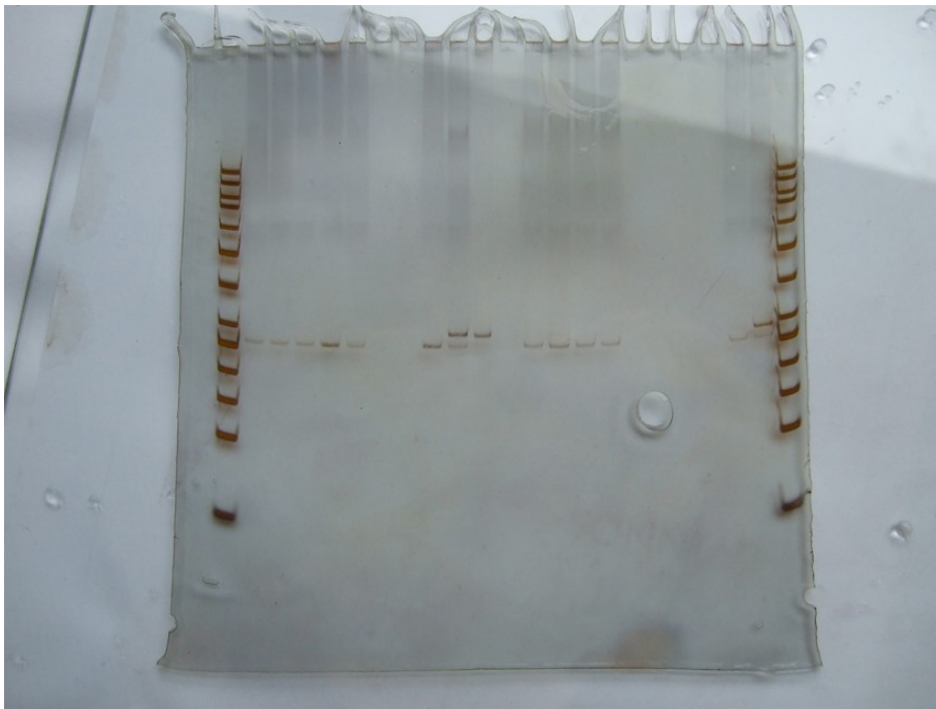


Abb. 41 Silbergefärbtes Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der Genanalyse, Bild 3

Bandenreihenfolge: 50 Bp-Leiter - SGN 5402 PP - SGN 5478 PP - SGN 5563 PP – (SGN 3228) - SGN 3259 – Leer – Leer - SGN 3228 - Mutationsprobe M - SGN 5402 PP unverdaut – Leer - SGN 5201 PP - SGN 5275 PP - SGN 5377 PP - SGN 5452 PP – Leer – Leer – Leer – Leer - SGN 5554 PP – M - 50 Bp-Leiter

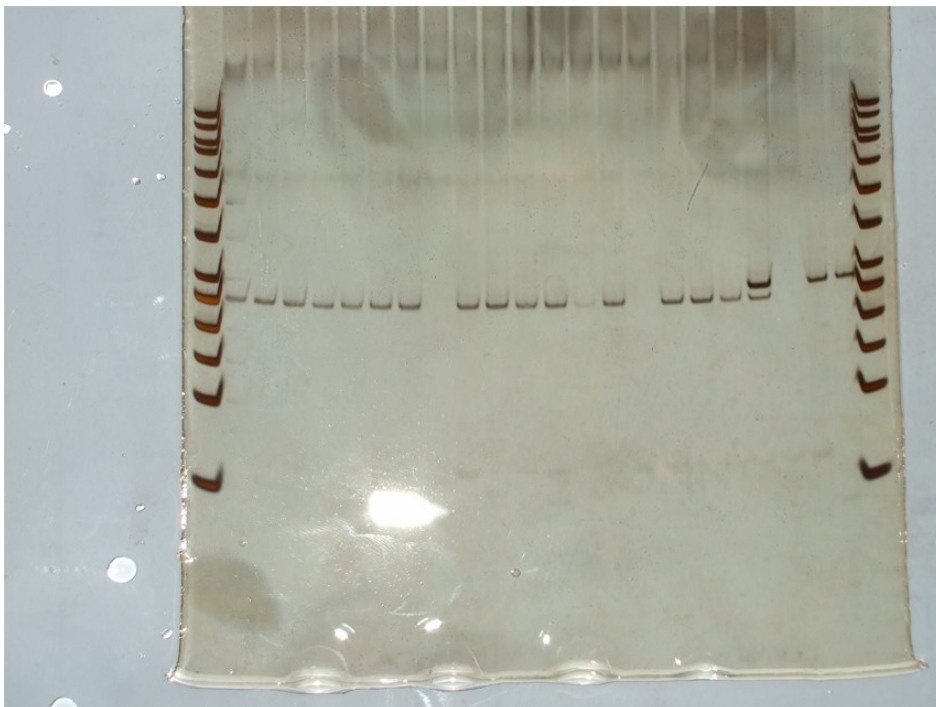


Abb. 42 Silbergefärbtes Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der Genanalyse, Bild 4

Bandenreihenfolge: 50 Bp-Leiter - SGN 5138 PP – (SGN 5448 PP) - SGN 5547 PP - SGN 5448 PP - SGN 5424 PP - SGN 5491 PP - SGN 3225 - Wasserprobe W - SGN 3256 - SGN 5129 PP - SGN 5199 PP - SGN 5264 PP - SGN 5375 PP - SGN 3039 – W - SGN 3109 - SGN 3246 - SGN 5057 PP - Mutationsprobe M – W - SGN 3256 unverdaut - SGN 3039 unverdaut - 50 Bp-Leiter

4. Ergebnisse

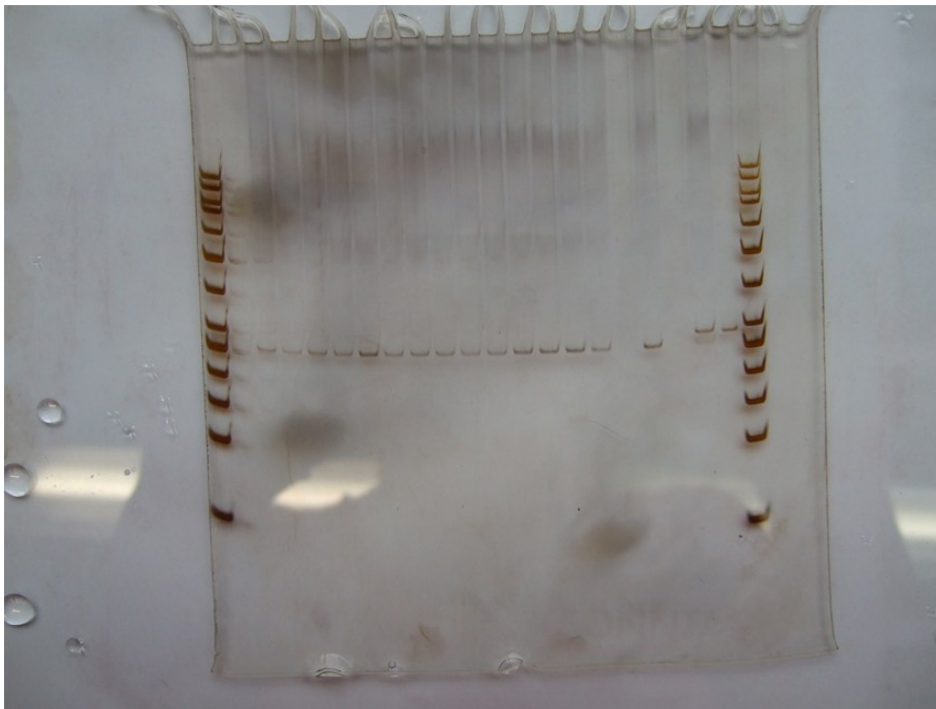


Abb. 43 Silbergefärbtes Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der Genanalyse, Bild 5

Bandenreihenfolge: 50 Bp-Leiter – Leer – SGN 3026 – SGN 3067 – SGN 3163 – SGN 3219 – SGN 3255 – SGN 5098 PP – SGN 5198 PP – SGN 5255 PP – SGN 5346 PP – SGN 5437 PP – SGN 5495 PP – SGN 3015 – SGN 3053 – SGN 3015 – Leer – SGN 3123 – Leer – Mutationsprobe M – SGN 3026 unverdaut – 50 Bp-Leiter

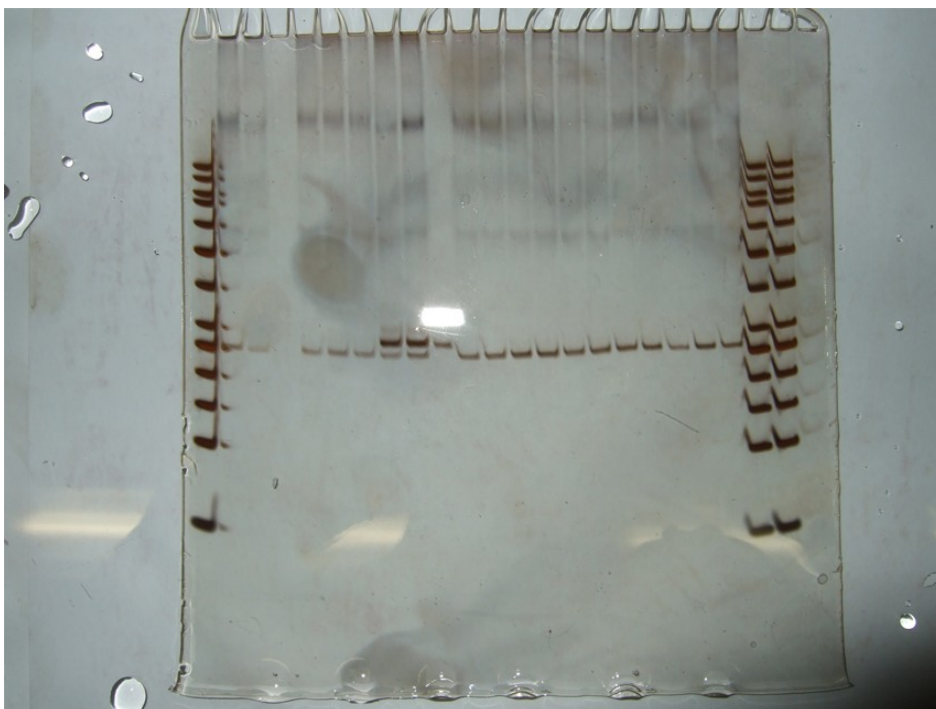


Abb. 44 Silbergefärbtes Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der Genanalyse, Bild 6

Bandenreihenfolge: 50 Bp-Leiter – SGN 3242 – SGN 3242 – Leer – SGN 5033 PP – SGN 5222 PP – SGN 5332 PP – Mutation probe M – M – SGN 3242 unverdaut – SGN 3008 – SGN 3111 – SGN 3170 – SGN 3232 – SGN 5030 PP – SGN 5205 PP – SGN 5304 PP – ? – SGN 5391 PP – SGN 5473 PP – SGN 5562 PP – 50 Bp-Leiter – 50 Bp-Leiter

4. Ergebnisse

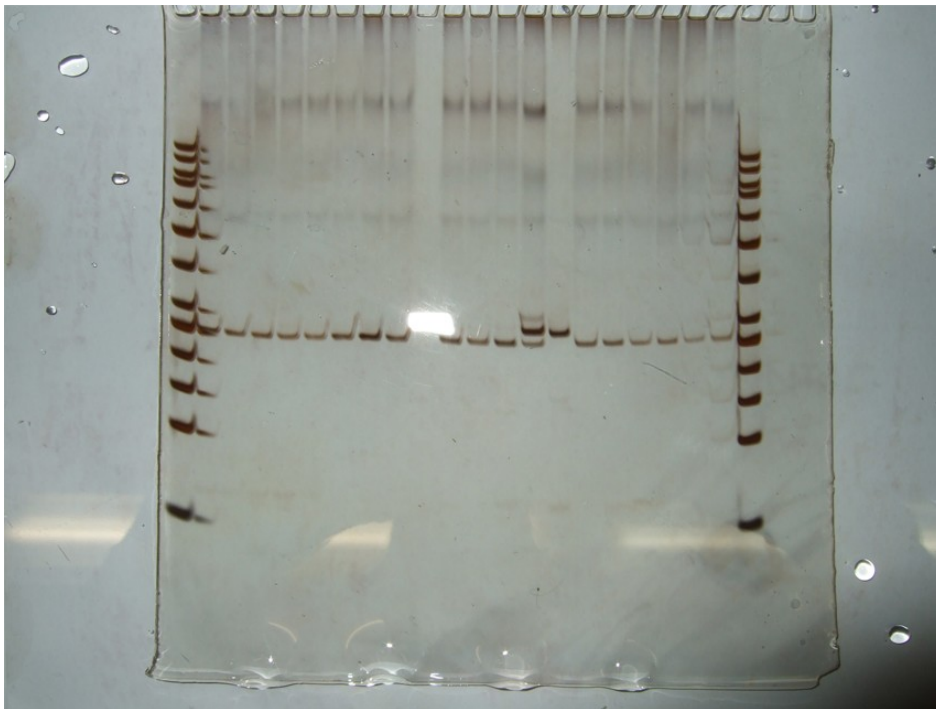


Abb. 45 Silbergefärbtes Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der Genanalyse, Bild 7

Bandenreihenfolge: 50 Bp-Leiter - SGN 3213 - SGN 5192 PP - SGN 5250 PP - SGN 5339 PP - SGN 5406 PP - SGN 5488 PP - SGN 6207 AB - SGN 5459 PP - Leer - SGN 5558 PP - SGN 3031 - SGN 3099 - Mutationsprobe M - SGN 3213 unverdaut - SGN 3168 - SGN 3029 - SGN 3087 - SGN 3164 - SGN 3112 - SGN 3210 - 50 Bp-Leiter

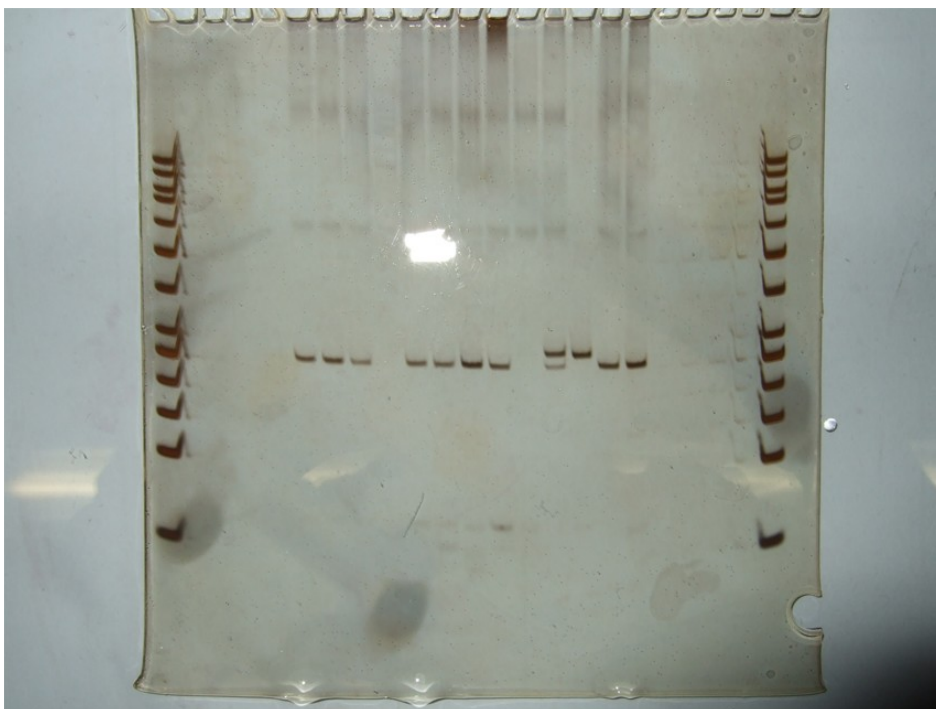


Abb. 46 Silbergefärbtes Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der Genanalyse, Bild 8

Bandenreihenfolge: 50 Bp-Leiter - Leer - Leer - Leer - Leer - A1 - A2 - A3 - Leer - A4 - A5 - A6 - A8 - Wasserprobe W - Mutationsprobe M - A1 unverdaut - SGN 5205 PP - SGN 3213 - Leer - Leer - Leer - Leer - 50 Bp-Leiter

4. Ergebnisse

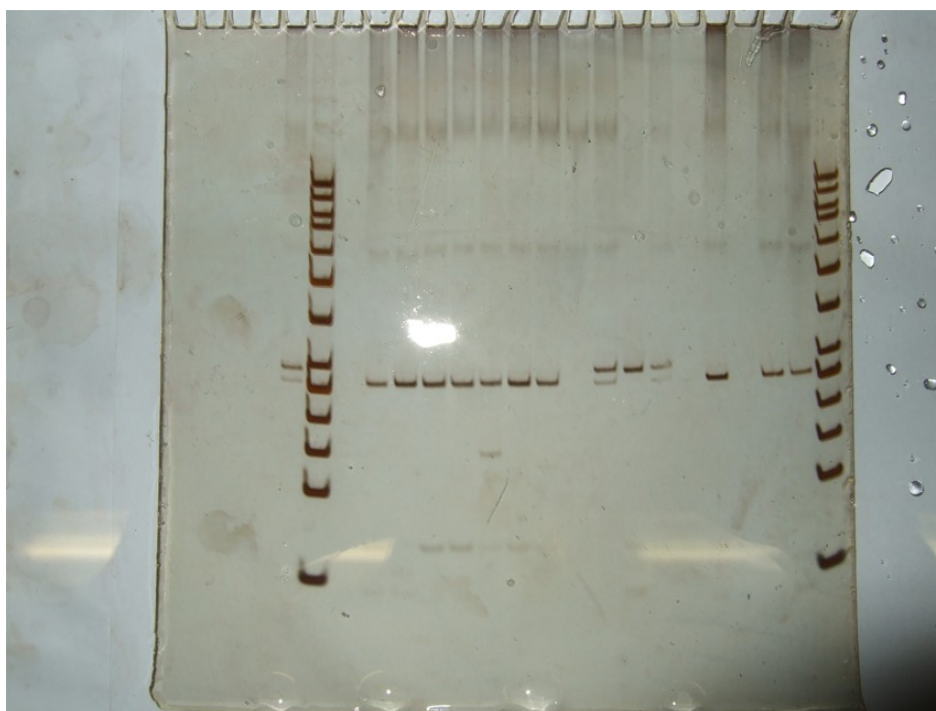


Abb. 47 Silbergefärbtes Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der Genanalyse, Bild 9
 Bandenreihenfolge: Mutationsprobe M - 50 Bp-Leiter - Leer - A9 - A10 - A11 - A12 - A13 - A14 - A15 - Wasser-
 probe W - M - A9 unverdaut - M - Leer - A16 - Leer - A17 - A18 - 50 Bp-Leiter

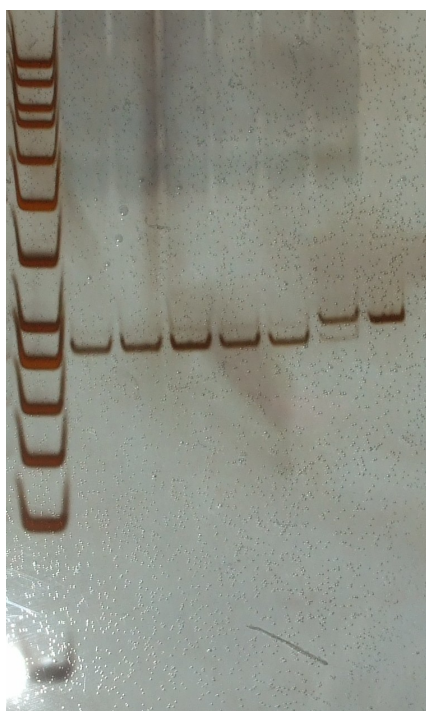


Abb. 48 Silbergefärbtes Polyacrylamidgel mit dem Ergebnis der Genanalyse, Bild 10
 Bandenreihenfolge: 50 Bp-Leiter - SGN 3049 - SGN 5159 PP - SGN 3009 - SGN 3051 - SGN 5187 PP - Mutations-
 probe M - SGN 3051 unverdaut

5. Diskussion

5. Diskussion

5.1. Kurze Zusammenfassung der Zielsetzung und der Ergebnisse der Dissertation

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob unter juvenilen Schizophreniepatienten mehr Mikrodeletion 22q11.2-Träger zu finden sind als in der Allgemeinbevölkerung und als bei adulten schizophrenen Patienten, und ob bei diesen juvenilen Patienten die, in einer norwegischen Epilepsiefamilie eng mit psychiatrischen Erkrankungen gekoppelte ADNFLE-Mutation *CHRNA4-776ins3* nachgewiesen werden kann. Diesen beiden Untersuchungen sollte ein konventionelles Chromosomenscreening mittels Karyotypisierung vorangehen, um zusätzlich mögliche unbekannte strukturelle Mutationen zu erfassen. Die Untersuchungen sollten bei positivem Befund dazu dienen, der komplexen Ätiopathogenese der Erkrankung Schizophrenie einen kleinen Schritt näher zu kommen. Andererseits würde ein fehlender Mutationsnachweis zeigen, dass bisher als Kandidaten gehandelte genetische Veränderungen bei zukünftigen Studien nicht mehr berücksichtigt werden müssten.

Bei der Karyotypisierung fand sich eine durchgehende, große perizentrische Inversion des Chromosoms 1 mit den Bruchstellen bei p31 und q25, es fanden sich zwei perizentrische Inversionen der Heterochromatinregion von Chromosom 9, Auffälligkeiten der Gonosomen sowie einzelne numerische/strukturelle Chromosomenaberrationen.

Die Mikrodeletion 22q11.2 bzw. die *CHRNA4-776ins3*-Mutation ließ sich bei keinem der untersuchten juvenilen Schizophreniepatienten nachweisen. Diese beiden genetischen Veränderungen spielen somit offenbar keine bedeutsame Rolle bei der Pathogenese juveniler Schizophrenien.

Bevor die einzelnen Ergebnisse genauer diskutiert werden, geht es im folgenden Kapitel um die Schwächen des verwendeten Zellmaterials:

5.2. Diskussion des Zellmaterials – Schwächen

Wie in Kapitel 2. dieser Arbeit beschrieben, stammten die verwendeten Zellproben aus zwei verschiedenen Quellen, und zwar waren sie im einen Fall Bestandteil einer groß-angelegten Schizophreniestudie der Psychiatrischen Klinik der LMU mit bereits vorgegebenen Einschluss- und Ausschlusskriterien, und im anderen Fall kamen sie aus kinder- und jugendpsychiatrischen Kliniken in Landshut, Passau, Regensburg und München. Dies zog eine gewisse Ungleichheit der Proben nach sich, was die Auswahl der jeweiligen Studienteilnehmer betraf. Diese Unterschiede ließen sich nicht vermeiden, da aufgrund der Seltenheit juveniler Schizophrenien keines der Subkollektive für sich genommen eine ausreichende Größe aufwies.

In erstere Studie wurden Patienten mit einem Alter bei Studiendurchführung von > 18 Jahren aufgenommen; für die Dissertation wurden diejenigen Studienteilnehmer daraus herangezogen, deren Erkrankungsbeginn vor dem 18. Lebensjahr lag (Beginn der Prodromalsymptome!). Patienten mit einer affektiven oder schizoaffectiven Störung sowie Patienten mit bestimmten physischen (z.B. neurologischen) Erkrankungen wurden von der Studienteilnahme ausgeschlossen. Die Zellproben wurden als EBV-transformierte Lymphozytenkulturen weiterverarbeitet.

5. Diskussion

Bei der zweiten Patientengruppe waren die Probanden zum Studienzeitpunkt v.a. < 18 Jahre alt (kinder- und jugendpsychiatrische Kliniken). Hier wurden neben schizophrenen auch affektive (v.a. bipolare) oder schizoaffektive Patienten mit in die Studie aufgenommen. Für die Studie fand keine zusätzliche Anamnese bzw. kein klinisches Interview statt, so wie dies bei ersterer Studiengruppe der Fall war; im Erhebungsbogen wurden der Grad der Diagnosesicherheit sowie ggf. mögliche Differenzialdiagnosen erfasst. Patienten mit bestimmten körperlichen Erkrankungen wurden nicht explizit ausgeschlossen, und das Erkrankungsalter war nicht näher definiert (Beginn prodromaler oder psychotischer Symptome?). Die Proben wurden als heparinisierte Blutproben zeitnah weiterverarbeitet.

Für die gesamte, kombinierte Studiengruppe war das starke Überwiegen des männlichen Geschlechts auffällig (82 männliche versus 27 weibliche Patienten); dies könnte das vorliegende Ergebnis durchaus beeinflusst haben. Dieses Geschlechterverhältnis ist am ehesten durch die kleine Stichprobengröße bedingt, da die Juvenile Schizophrenie als gleich häufig bei Mädchen und Jungen angegeben wird (z.B. Remschmidt/Theisen, 2012), siehe hierzu auch das Kapitel 1.3.. Bei den erwachsenen Schizophreniepatienten erkranken die Männer im Schnitt fünf Jahre vor den Frauen und haben gleichzeitig eine ungünstigere Prognose.

Eine weitere Schwäche im Bezug auf das Material ist möglicherweise das Fehlen einer Kontrollgruppe, was aufgrund der unauffälligen Befunde bei der Mikrodeletion 22q11- und bei der *CHRNA4-776ins3*-Analyse weniger ins Gewicht fällt, als dies für ein positives Ergebnis der Fall gewesen wäre. Was die Mikrodeletion betrifft, so hätten jedoch auch die für die Allgemeinbevölkerung bekannten Prävalenzzahlen als Kontrollwerte fungieren können.

5.3. Chromosomenanalyse

5.3.1. Diskussion der Methode

Bei den Zellproben aus der Psychiatrischen Klinik der LMU erfolgte die Karyotypisierung anhand von Epstein Barr-Virus-transformierten und nach der Stickstoff-Kryokonservierung wieder hochgezüchteten Lymphozytenkulturen, wohingegen die Chromosomenanalyse der Proben aus den kinder- und jugendpsychiatrischen Kliniken direkt aus heparinisierten Blutproben erfolgte.

Hinsichtlich beider Verfahren gab es einige Einflussgrößen und Störfaktoren die Qualität der erhaltenen Mitosefiguren und Chromosomen betreffend, die in den jeweiligen Methodikkapiteln (Kapitel 3.) beschrieben sind. Auffällig war, dass die aus den EBV-transformierten Lymphozytenkulturen präparierten Chromosomen zumeist eine deutlich schlechtere GTG-Bandenauflösung aufwiesen als die direkt aus den heparinisierten Blutproben gewonnenen Chromosomen. Durch diesen Sachverhalt könnte es sein, dass möglicherweise bei den Zellproben aus der Psychiatrischen Klinik der LMU vorliegende, kleinere strukturelle Chromosomenaberrationen unerkannt geblieben sind. Bei den EBV-transformierten Lymphozytenkulturen konnten außerdem mehr Einzellzellauffälligkeiten – wahrscheinlich in vitro entstandene, chromosomale Veränderungen – gefunden werden als dies für die Blutproben der Fall war (22% versus 7%).

5. Diskussion

5.3.2. Eigenes Ergebnis

5.3.2.1. Perizentrische Inversion *inv(1) (p31q25)*

Der Patient mit der Studiennummer SGN 5473 PP wies eine durchgehende, d.h. eine in allen analysierten Mitosen zu findende, perizentrische Inversion eines der Chromosomen 1 auf, deren Bruchpunkte bei p31 und q25 lagen. Es handelt sich folglich um eine recht große Inversion.

Bei einer Inversion ganz allgemein wird ein genetischer Abschnitt aus dem Chromosom herausgebrochen, umgedreht und wieder an selber Stelle eingesetzt. Auffällig werden Inversionen v.a. wenn die Bruchpunkte der Inversion in einem wichtigen Gen gelegen sind, so dass dessen Funktion beeinträchtigt ist. Befinden sich regulatorische Sequenzelemente im Bereich der Inversion, so kann es auch zu Störungen bei der Expression einzelner Gene kommen. Außerdem kann eine Inversion zu einer erhöhten Fehlgeburtenrate führen, da es bei der Paarung der homologen Chromosomen in der Meiose durch die Inversion zu falschen Segmentaustauschen kommen kann, die dann für das ungeborene Leben letal sein können. Das Vorliegen einer Inversion bei einem Individuum kann bei den Nachkommen zu einem unbalancierten Chromosomensatz mit einem zu-Wenig oder zu-Viel an genetischer Information führen, was dann in einer veränderten Gendosis bestimmter betroffener Gene resultieren kann (<http://www.mangen.co.uk/media/21963/chromosome%inversions.pdf>).

Was die Inversion hier betrifft, so konnte in der Literatur keine Beschreibung der gleichen Inversion im Zusammenhang mit Schizophrenie oder im Zusammenhang mit einer anderen Erkrankung gefunden werden. Sieht man sich das Chromosom 1 mit seiner Genstruktur jedoch an, so erkennt man, dass an den Bruchstellen der *inv(1) (p31q25)* sowie im invertierten Bereich viele Suszeptibilitäts-gene für Schizophrenie gelegen sind (siehe Abb. 49). In der Linkage-Metaanalyse von Ng et al., 2009 wurden zwei signifikante Kopplungsregionen für Schizophrenie auf dem Chromosom 1 gefunden, und zwar die Regionen 1p32.2-31.1 und 1p13.2-q23.3. Erstere Kopplungsregion beinhaltet den Bereich der proximalen Bruchstelle der in dieser Arbeit gefundenen *inv(1)*, die zweite Kopplungsregion befindet sich nicht weit von der distal-gelegenen Bruchstelle auf dem q-Arm entfernt; sie befindet sich im hier invertierten Bereich.

5. Diskussion

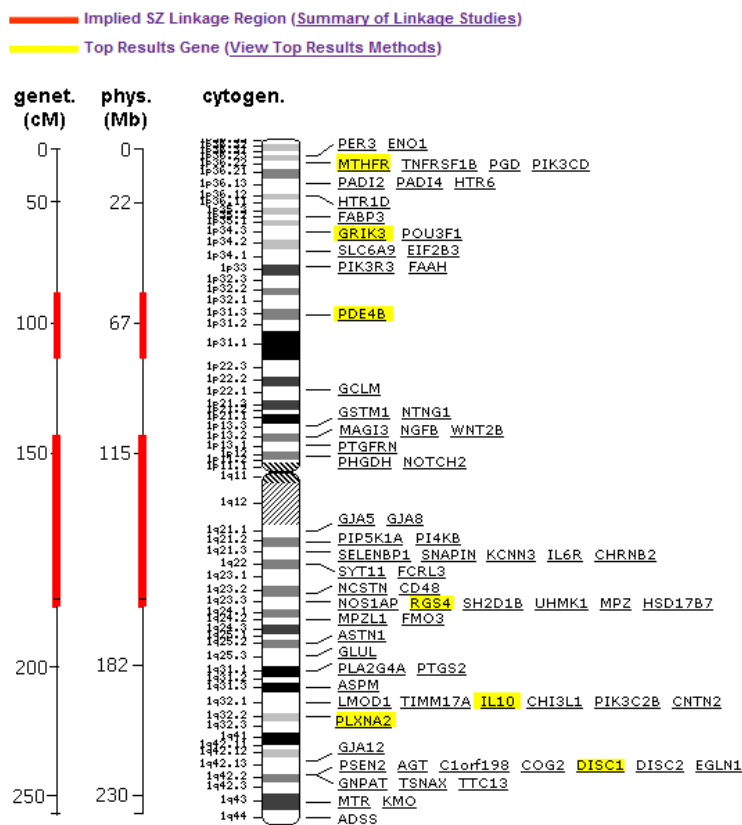


Abb. 49 Suszeptibilitätsgene für Schizophrenie auf Chromosom 1 (<http://www.szgene.org/chromo.asp?c=1>)

Drei Kandidatengene für Schizophrenie befinden sich direkt innerhalb der Bruchpunktregionen der hier in dieser Arbeit gefundenen inv(1) (p31q25), und zwar die Gene *PDE4B* (proximale Bruchstelle auf dem p-Arm), *ASTN1* und *GLUL* (jeweils distale Bruchstelle auf dem q-Arm von Chromosom 1).

PDE4B:

Dieses Gen liegt in der signifikanten Kopplungsregion 1p32.2-31.1. Es kodiert die Phosphodiesterase 4B, welche cAMP, einen second messenger der Signaltransduktion hydrolysiert, somit inaktiviert und cAMP-gesteuerte Signalkaskaden zum Erliegen bringt (Millar et al., 2005; Millar et al., 2007). cAMP (= zyklisches Adenosinmonophosphat) ist u.a. an Prozessen des Lernens, des Gedächtnisses und der Stimmung beteiligt (Millar et al., 2005). Man hat herausgefunden, dass die PDE4B mit DISC1 (= disrupted in schizophrenia 1, siehe Abb. 49) interagiert, und zwar ist diese Interaktion abhängig von cAMP; ein hoher cAMP-Spiegel bewirkt so die Dissoziation der PDE4B aus dem PDE4B-DISC1-Komplex und resultiert in einer gesteigerten Aktivität der PDE4B, so dass mehr cAMP inaktiviert wird (Millar et al., 2005). Sowohl das *PDE4B*-Gen als auch das *DISC1*-Gen sind sogenannte Top-Kandidatengene für Schizophrenie. In einigen Studien wurde die Assoziation von Polymorphismen des *PDE4B*-Gens mit Schizophrenie untersucht, und viele Studien fanden eine positive Assoziation; für eine Übersicht siehe <http://www.szgene.org/geneoverview.asp?geneid=492>. In Studien konnte auch gezeigt werden, dass bei einem, z.B. durch eine Translokation beeinträchtigten *PDE4B*-Gen, die Expression der Phosphodiesterase 4B reduziert ist, was in der Folge zu neuropsychiatrischen Symptomen führen kann (Millar et al., 2005).

Es ist denkbar, dass durch die in dieser Dissertationsarbeit gefundene inv(1) (p31q25) das *PDE4B*-Gen beim Patienten, bedingt durch seine Lage in der proximalen Bruchpunktregion, geschädigt

5. Diskussion

worden ist; infolgedessen könnte bei diesem Patienten eine Fehlregulation der intrazellulären cAMP-Signalgebung zur Entstehung der Schizophrenie beigetragen haben.

ASTN1 (= Astrotactin 1):

Kähler et al. führten 2008 eine Assoziationsstudie für Schizophrenie durch, in der mehrere Gene untersucht wurden, die an der neuronalen Migration beteiligt sind. Für insgesamt 19 Marker, u.a. für einen Marker im *ASTN1*-Gen ergab sich ein signifikantes Ergebnis, wobei 839 schizophrene Patienten und 1.473 Kontrollen in die Studie eingeschlossen waren. Das ASTN1-Protein ist an der Adhäsion zwischen radialen Gliazellen und Neuronen beteiligt.

GLUL:

GLUL (= Glutaminsynthetase) kommt aufgrund seiner Funktion im glutamatergen System als Schizophrenie-Kandidatengens infrage. Bisher wurde in zwei Studien die Assoziation dieses Gens mit der Schizophrenie untersucht; beide Studien erbrachten jedoch ein negatives bzw. nicht-signifikantes Ergebnis (Arai et al., 2009; Zhang et al., 2005).

Die eben beschriebenen Gene *PDE4B*, *ASTN1* und *GLUL* könnten durch ihre direkte Lage in den Bruchpunktregionen der gefundenen inv(1) (p31q25) (mit-)verantwortlich sein für die Krankheitsentstehung des Patienten SGN 5473 PP.

Außerdem könnte die inv(1) dazu führen, dass regulatorische Mechanismen der Genexpression, wie z.B. die sogenannten cis-Elemente der DNA (darunter Enhancer- oder Silencer-Elemente) geschädigt werden. Diese regulatorischen Elemente können mehrere Tausend Bp von den durch sie regulierten Genen entfernt auf dem Chromosom liegen. Auch die Interaktion der Enhancer bzw. Silencer mit der Promotorregion könnte durch die Inversion beeinträchtigt sein. Durch eine Störung dieser Regulationsmechanismen wäre es möglich, dass auch Gene außerhalb der Bruchpunktregionen durch die Inversion in ihrer Funktion eingeschränkt sind. Hingewiesen werden soll in diesem Zusammenhang auch auf das *CHRNA2*-Gen, welches sich auf Chromosom 1q21.3 befindet, für die $\beta 2$ -Untereinheit des neuronalen nAChR kodiert, und welches für einige Fälle der ADNFE als verantwortlich gefunden wurde (siehe hierzu auch Abb. 52 im Anhang).

Weiterführende Untersuchung beim Patienten könnte eine Array-CGH sein, um herauszufinden, ob die Inversion unbalanciert ist, d.h. ob eine Deletion oder Duplikation in den Bruchpunktregionen beim Patienten vorliegt. Alternativ könnten auch FISH-Sonden für die Bruchpunktregionen zum Einsatz kommen.

5.3.2.2. Perizentrische Inversion der Heterochromatinregion von Chromosom 9

Bei zwei Probanden konnte in der hier vorliegenden Arbeit eine perizentrische Inversion der heterochromatischen Region von Chromosom 9 gefunden werden (inv(9) (p11q12 oder p11q13, nicht näher differenziert).

Die perizentrische Inversion des Chromosoms 9, inv(9) (p11q13) ist die häufigste Inversion in der Allgemeinbevölkerung (Tural et al., 2007). Die Prävalenz dieser Inversion ist abhängig von der ethnischen Herkunft der untersuchten Gruppe (Demirhan/Taştemir, 2003). So gaben Serra et al., 1990 eine Prävalenz von 0.85% und Hsu et al., 1987 eine Inzidenz von 0.73% für Kaukasier an. Obwohl die perizentrische Inversion der Heterochromatinregion von Chromosom 9 als eine normale familiäre Karyotypvariante betrachtet wird, kann sie dennoch mit verschiedenen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden wie z.B. mit habituellen Aborten, Fehlbildungen der kranio-

5. Diskussion

fazialen Region, mentaler Retardierung, Herzfehlern, usw. (Akbas et al., 2010; Lourenço et al., 2007; Ramegowda et al., 2007). Studien lassen vermuten, dass die perizentrische Inversion von Chromosom 9 auch ursächlich mit der Schizophrenie in Zusammenhang stehen könnte, und einige Studien konnten eine erhöhte Prävalenz der inv(9) bei schizophrenen Patienten finden (Demirhan/Taştemir, 2003). So fanden Axelsson/Wahlström, 1984 eine stark erhöhte Prävalenz der inv(9) von 9.7% bei Männern mit einer paranoiden Psychose, und Kunugi et al., 1999 berichteten von einer Rate der inv(9) von 4% bei ihren schizophrenen Patienten. Bei Demirhan/Taştemir wiesen 5.2% der 134 untersuchten Schizophreniepatienten Auffälligkeiten der perizentromerischen Region von Chromosom 9 auf (inv(9) (p11q13), del(9) (q11q13) und 9qh+). Die inv(9) betreffend, könnte es sein, dass die Lokalisation der Bruchpunkte zur Klonierung schizophrener Suszeptibilitätsgene führt (Demirhan/Taştemir, 2003).

In der vorliegenden Dissertationsstudie wiesen zwei von 104 analysierten Patienten (bei fünf der insgesamt 109 Patienten konnte keine Karyotypisierung durchgeführt werden, siehe hierzu Kapitel 4.2.) eine perizentrische Inversion der Heterochromatinregion von Chromosom 9 auf, was einem Prozentsatz von 1.9% entspricht und somit höher liegt als der für die europäische Allgemeinbevölkerung angegebene Prozentsatz.

5.3.2.3. Marker-Chromosomen

Beim Probanden mit der Bezeichnung SGN 5375 PP war ein fragliches Markerchromosom auffällig, und der Patient SGN 5275 PP wies in drei von zehn analysierten Mitosen einen Marker auf. Auch azentrische Chromosomen konnten in dieser Dissertation gefunden werden (siehe Tabelle 7 in Kapitel 4.2.7.).

Man schätzt, dass Marker-Chromosomen bei 0.05% aller Lebendgeburten vorkommen (Buckton et al., 1985), und Einige von ihnen sind mit einem mentalen Handicap oder mit physischen Auffälligkeiten verbunden. Am häufigsten findet sich das idic(15)-Marker-Chromosom, für dessen Euchromatin-entfaltende Variante es ein klares Risiko für Autismus, mentale Retardierung, Anfälle und faziale Dysmorphien gibt (Mann et al., 2001). Auch in der bereits im vorigen Kapitel angegebene Studie von Demirhan/Taştemir, 2003, konnte bei drei von insgesamt 134 analysierten Schizophreniepatienten ein jeweils singuläres Marker-Chromosom gefunden werden.

Aufgrund des schlechten Zellmaterials von SGN 5275 PP konnten die bei dieser Probe aufgefallenen Marker-Chromosomen leider nicht näher spezifiziert bzw. deren Herkunft nicht geklärt werden.

5.3.2.4. Auffälligkeiten der Gonosomen

Bei der Patientenprobe SGN 5275 PP konnte außerdem eine nicht konsistente Auffälligkeit des Y-Chromosoms, am ehesten einer Inversion entsprechend, gefunden werden. A17, ein weiterer Patient, wies einen vergrößerten Heterochromatinbereich von Chromosom Yq auf. Bei den singulären Chromosomenveränderungen (siehe Tabelle 7 in Kapitel 4.2.7.) waren eine Translokation und eine Derivation, das X-Chromosom betreffend, auffällig.

Schon 1989 behaupteten DeLisi und Crow, die Gonosomen seien sehr gute Kandidaten, wenn es um die Suche nach genetischen Loci gehe, die verantwortlich seien für die Entstehung einer Schizophrenie oder einer affektiven Psychose. Geschlechtsunterschiede in der klinischen Expression der Erkrankung und der familiären Risiken, eine Konkordanz von Geschlecht und Erkrankung bei Verwandten und die Assoziation von Anomalien des X-Chromosoms mit psychotischen Symptomen, würden einen X-chromosomal Suszeptibilitätslocus für die Psychosen vermuten lassen (DeLisi/Crow, 1989). Dieselben Autoren geben ein mäßig-erhöhtes Vorkommen eines Karyotyps XXY

5. Diskussion

(Klinefelter-Syndrom) und eines Karyotyps XXX (Triple X-Syndrom) unter psychiatrischen, stationären Patienten an, wenngleich auch diese Auffälligkeiten nur für einen kleinen Teil der Psychosetfälle verantwortlich sind. Bei im Kindesalter an Schizophrenie erkrankten Patienten sind laut Eckstrand et al., 2008 subsyndromale gonosomale Auffälligkeiten (die Autoren beschreiben bei insgesamt 92 COS-Patienten zwei Fälle eines atypischen bzw. Mosaik-Turner-Syndroms und eine Trisomie X) signifikant häufiger als in der Allgemeinbevölkerung und als bei später erst erkrankten, adulten Patienten. Die Rolle dieser Auffälligkeiten im Kontext der Schizophrenie, so Eckstrand, sei jedoch unklar, möglicherweise könne die Dysregulation emotionaler Informationsverarbeitung relevant sein. Umgekehrt zu bereits Gesagtem gibt es einige Fallberichte von Patienten mit Klinefelter-, Triple X- oder Turner-Syndrom sowie von Patienten mit XYY-Syndrom, die Schizophrenie-ähnliche Symptome aufweisen (DeLisi/Crow, 1989; Roser/Kawohl, 2010). V.a. die pseudoautosomalen Regionen des X- und des Y-Chromosoms mit Sequenzhomologien und einer hohen Rekombinationsrate in der männlichen Meiose sind interessant, wenn man nach schizophrenen Kandidatengen auf den Gonosomen sucht (DeLisi/Crow, 1989; Burgoyne, 1982). Außerdem gibt es Gene, die außerhalb der pseudoautosomalen Region des X-Chromosoms gelegen sind, und die, so wie die pseudoautosomale Region, der normalen, eigentlich Frauen-spezifischen Inaktivierung eines der X-Chromosomen entgehen und somit als Kandidatengene für Schizophrenie infrage kommen (Davies, 1991). Zu nennen wäre hier z.B. das Gen *XIST* (= X_i -specific transcripts), welches innerhalb von Xq13 gelegen ist (diese Region enthält das sogenannte X-Inaktivierungszentrum) und eine Rolle im X-Inaktivierungsprozess spielt (Roser/Kawohl, 2010). Auch das sogenannte *HOPA*-Gen (*HOPA* = human opposite paired) derselben Chromosomenregion Xq13, welches an Prozessen der Neurodifferenzierung beteiligt ist, kommt als Kandidatengen infrage (Roser/Kawohl, 2010). Interessant ist auch eine kürzlich veröffentlichte Studie, in der man herausgefunden hat, dass die *SRY*-Region (*SRY* = sex-determining region des Y-Chromosoms) eine Rolle spielen könnte als positiver Regulator der Catecholamin- (v.a. Dopamin-)Synthese und des Catecholamin-Metabolismus im menschlichen, männlichen Mittelhirn (Czech et al., 2012).

In der Literatur wird eine Y-chromosomale Inversion wie sie beim Patienten mit der Studiennummer SGN 5275 PP vermutet wird, im Zusammenhang mit der Schizophrenie nicht beschrieben. Leider war die Qualität des vom Patienten gewonnenen Zellmaterials sehr schlecht, so dass die aufgefallene Chromosomenveränderung nicht näher spezifiziert werden konnte; somit war eine abschließende Beurteilung darüber, ob das veränderte Y-Chromosom die Schizophrenie des betroffenen Patienten mitbedingt haben könnte, hier nicht möglich.

Was die bei einem Probanden in dieser Dissertation aufgefallene Heterochromatinvariante Yqh+ betrifft, so wird eine signifikante Häufung dieser Variante in vorhandenen Publikationen bei Schizophreniepatienten zwar nicht beschrieben; die Yqh+-Variante scheint jedoch mit einem erhöhten Risiko für eine Infertilität bzw. Fehlgeburtenrate assoziiert zu sein (z.B. De la Fuente-Cortés et al., 2009).

5.3.2.5. Kulturartefakte und einzelne numerische/strukturelle Chromosomenaberrationen

Da zwei der in Kapitel 4.2. geschilderten Ergebnisse in der Wiederholung mit einer anderen Charge des jeweils selben Patienten nicht repliziert werden konnten (siehe Kapitel 4.2.4., Mosaik-Trisomie und Kapitel 4.2.6., komplexe chromosomale Aberration), müssen diese Auffälligkeiten als Kulturartefakte, d.h. als in der Kultur entstanden, gelten. Bei einer Zellprobe konnten sequenzielle Chromosomenveränderungen gefunden werden, so dass auch hier von einem Kulturartefakt auszugehen ist (siehe hierzu auch Kapitel 4.2.5. des Ergebnisteils). Durch die Anregung der Zellen zur Zellteilung

5. Diskussion

während der Kultivierung können chromosomale Veränderungen in vitro entstehen, die beim Patienten selbst gar nicht vorliegen (siehe hierzu auch den folgenden Abschnitt).

Bei einigen Patientenproben (22% bei den Proben aus der Psychiatrischen Klinik der LMU und 7% bei den Proben aus den kinder- und jugendpsychiatrischen Kliniken Landshut, Passau, Regensburg und München) waren einzelne, d.h. jeweils nur in einer einzigen Mitose vorkommende, numerische oder strukturelle Chromosomenveränderungen zu finden. Dabei kann nicht abschließend geklärt werden, ob diese singulären Auffälligkeiten erst in vitro entstanden sind – dies ist v.a. angesichts der höheren Rate bei den EBV-Zellen mit erfolgter Kryokonservierung vor der kulturellen Aufzucht sehr gut möglich und eher wahrscheinlich –, oder ob es sich bei den beobachteten Auffälligkeiten um tatsächliche Chromosomenveränderungen der Probanden handelt (das hieße ein niedriggradiges Mosaik), die jedoch dann nur fraglich pathogen und nicht spezifisch wären. Für ein tatsächliches Vorliegen der Veränderungen bei den Probanden könnte sprechen, dass auch in anderen Karyotypisierungsstudien hohe Raten an einzelnen Chromosomenveränderungen bei schizophrenen Patienten gefunden werden konnten (siehe hierzu z.B. die Studie von Demirhan/Taştemir, 2003).

5.3.2.6. Schlussfolgerung aus den eigenen Ergebnissen

Die Ergebnisse der Dissertation zeigen, dass Karyotypisierungen zur Aufklärung der Pathogenese der Schizophrenie beitragen können. Die beobachteten Veränderungen hätten nicht mit anderen, z.T. neueren und als innovativ geltenden Methoden entdeckt werden können. Die Karyotypisierung wird somit auch in Zukunft nicht zu ersetzen sein. Leider sind Karyotypisierungen aufwändig und teuer, so dass sie für die Untersuchung eines größeren Patientenkollektivs eher nicht geeignet sind.

5.4. Mikrodeletion 22q11.2

5.4.1. Diskussion der Methode

Die Mikrodeletion 22q11.2-Analyse erfolgte mithilfe der FISH, eine Methode, die im Institut für Humangenetik der LMU standardmäßig angewandt wird, um bei auffälligen Patienten die subchromosomale Mikrodeletion 22q11.2 nachzuweisen bzw. ggf. auszuschließen. Die FISH gilt zu diesem Zweck bisher noch als Methode der Wahl, wenn klinisch ausreichender Anhalt für das 22q11.2-Deletionssyndrom besteht. Kommerziell sind für die Mikrodeletion 22q11.2-Analyse zwei verschiedene FISH-Sondenproben verfügbar, und zwar die auch hier verwendete Probe TUPLE 1 und die Probe N25. Laut McDonald-McGinn et al., 2013 wird die Detektionsrate dieser beiden Sondenproben als äquivalent angesehen, die beiden Sondenproben sind jedoch nicht sensitiv genug, um kleine 22q11.2-Deletionen < 40 Kb zu detektieren. Auch Punktmutationen oder chromosomale Umlagerungen, die die Region 22q11.2 (oder selten auch andere Regionen wie die Region 10p13-p14 (Hay, 2007)) involvieren und bei den Patienten zum klinischen Bild eines 22q11.2-Deletionssyndrom führen, können mithilfe der genannten Proben nicht detektiert werden (wobei laut Robin/Shprintzen, 2005 ohne Mikrodeletion 22q11.2 auch kein 22q11.2-Deletionssyndrom vorliegt). Die Patienten ohne die typischen Mikrodeletion 22q11.2-Bereiche machen jedoch nur einen kleinen Teil der Patienten von ca. 1% aus (siehe Abb. 2 in Kapitel 1.7.3.1.).

In den Referenzstudien zu dieser Dissertation wurde z.T. statt der FISH primär eine Mikrosatellitenmarker- und SNP-Analyse angewandt (siehe hierzu die folgenden Kapitel), die zwar kostengünstiger als die FISH ist, jedoch die Verifizierung eines auffälligen Ergebnisses wiederum mithilfe der

5. Diskussion

FISH erforderlich macht; im Falle des Vorhandenseins von jeweils nur einem Allel eines jeden verwendeten Markers muss nämlich zwischen einer Homozygotie für alle Marker und einem hemizygoten Zustand der untersuchten Region, d.h. hier einer Mikrodeletion 22q11.2, unterschieden werden (Ivanov et al., 2003).

Aktueller ist die sogenannte MLPA-Methode (MLPA = Multiplex ligation-dependent probe amplification assay), mit der zu Forschungszwecken ebenfalls Mikrodeletionen 22q11.2 detektiert werden können (McDonald-McGinn et al., 2013; Schouten et al., 2002). Bei der MLPA handelt es sich um eine Technik zur Bestimmung der relativen Kopienzahl einer genomischen Zielsequenz, wobei gleichzeitig 40 verschiedene DNA-Sequenzen mit nur 20 ng menschlicher DNA untersucht werden können (Schouten et al., 2002). Zu den neueren diagnostischen Verfahren zählt auch die in Kapitel 5.6.1 beschriebene genomweite CNV-Analyse mittels microArray, durch die jedoch nicht spezifisch die Mikrodeletion 22q11.2, sondern auch andere CNVs (= Copy number variants) detektiert werden. Zu Forschungszwecken, und v.a. auch zur Detektion unikaler Deletionen im Bereich 22q11.2, kommen auch direkte DNA-Methoden wie verschiedene und mittlerweile kosteneffektive Sequenzieretechniken (next generation sequencing) zum Einsatz.

5.4.2. Eigenes Ergebnis

Bei keinem der getesteten Probanden konnte eine Mikrodeletion 22q11.2 in der Fluoreszenz in situ-Hybridisierung nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit der, in der Allgemeinbevölkerung für die Mikrodeletion 22q11.2 zu findenden Prävalenz von ca. 1:4.000.

5.4.3. Vergleich des eigenen Ergebnisses mit der bestehenden Literatur

Im Gegensatz zu Mikrodeletion 22q11.2-Prävalenzstudien bei erwachsenen Schizophreniepatienten, gibt es nur wenige solcher Studien bei jung-erkrankten Schizophreniepatienten. Diese Studien sollen im Folgenden beschrieben werden, bevor dann ein abschließender Vergleich mit dem eigenen Ergebnis aus dieser Dissertationsarbeit angestellt wird und Schlussfolgerungen gezogen werden.

5.4.3.1. Studie von Ivanov et al., 2003

Ivanov et al. untersuchten die Häufigkeit eines 22q11.2-Deletionssyndroms bei 192 Patienten mit einer Early-onset Psychose und bei 329 adulten Schizophreniepatienten.

Die Early-onset Patienten wurden sowohl in England als auch in Bulgarien rekrutiert, die erste psychotische Episode mit dem Auftreten von Wahnvorstellungen, Halluzinationen oder einer Manie, lag vor dem 18. Geburtstag. Abb. 50 zeigt die Altersverteilung der juvenilen Psychosepatienten. Insgesamt waren 96 juvenil-erkrankte Patienten männlich und 96 weiblich.

5. Diskussion

Age at onset (years)	Schizophrenia, Bulgaria	Bipolar I, Bulgaria	Schizophrenia, UK	Bipolar I, UK	Total cases
7	–	–	1	–	1 (0.5%)
8	–	–	–	1	1 (0.5%)
9	1	–	–	–	1 (0.5%)
10	–	–	2	–	2 (1.0%)
12	1	–	2	–	3 (1.6%)
13	3	1	4	1	9 (4.7%)
14	4	5	11	2	22 (11.5%)
15	14	5	16	–	35 (18.2%)
16	13	10	12	8	43 (22.4%)
17	19	11	38	7	75 (39.1%)
Total	55	32	86	19	192

Abb. 50 Altersverteilung der juvenilen Psychosepatienten bei Ivanov et al., 2003

Die 329 adulten Schizophreniepatienten stammten aus England und konnten die Kriterien für ein juveniles Erkrankungsalter nicht erfüllen, da der Krankheitsbeginn entweder klar im Alter von > 18 Jahren lag, oder da es zu wenige Informationen zum jeweiligen Probanden gab, um das Erkrankungsalter genau und präzise festzulegen.

Patienten mit einem IQ von < 70 wurden von der Studienteilnahme ausgeschlossen. Jeder Patient war bei Studiendurchführung volljährig.

Alle Patienten wurden mit einer verkürzten Form des SCAN (= Schedules for Clinical Assessment in Neuropsychiatry) interviewt, und es wurde die beste Consensus-Diagnose auf der Basis dieses Interviews und auf der Basis bestehender Krankenhausnotizen nach DSM IV festgelegt. Die Teams in England und Bulgarien verwendeten die gleichen klinischen Instrumente.

Die Kontrollgruppe bestand aus 444, nach Alter und Geschlecht „gematchten“, gesunden Individuen.

Die Mikrodeletion 22q11.2-Analyse erfolgte unter Verwendung von fünf Mikrosatellitenmarkern und einem SNP des *COMT*-Gens (Val158Met). Zur Verifizierung eines auffälligen Ergebnisses sollte entweder eine FISH (bei Verfügbarkeit von Zelllinien des betroffenen Individuums) oder eine semiquantitative PCR durchgeführt werden. Die Mikrosatellitenmarker für die juvenil-erkrankten Probanden waren: D22S264, D22S941, D22S944, AC000068.2 (CA-Repeat) und PCQAP (CAG-Repeat). Alle Marker mit Ausnahme von PCQAP liegen im „typischen“ 1.5 Mb-großen Deletionsbereich. Für die semiquantitative PCR wurde ein Fragment innerhalb von Exon 5 des *COMT*-Gens, welches bei einer Mikrodeletion 22q11.2 deletiert ist, sowie ein Fragment innerhalb von Exon 11 des *ABCG1*-Gens (auf Chromosom 21 gelegen) verwendet.

In der Studie von Ivanov et al., 2003 wurde ein Patient gefunden, der für alle verwendeten Marker homozygot war, der auch im Rahmen von anderen Forschungsprojekten der Autoren für mehrere SNPs in den drei Genen *COMT*, *ARVCF* und *TBX1* getestet wurde, und dessen Mikrodeletion 22q11.2 durch die semiquantitative PCR bestätigt wurde. Der gefundene Mikrodeletionspatient gehörte nicht der juvenilen, sondern der zusätzlichen „adulten“ Probandengruppe an. Laut eigenen Angaben habe der Patient im Alter von 17 Jahren die ersten Krankheitssignale entwickelt und habe seinen Vater für den Teufel gehalten; jedoch gab es keine Krankenhausaufzeichnungen darüber, so dass der Patient die Einschlusskriterien für die Early-onset-Psychosegruppe nicht erfüllen konnte.

Insgesamt ergab sich in dieser Studie eine Häufigkeit der Mikrodeletion 22q11.2 von 0% bei 192 früh-erkrankten psychotischen Patienten.

5. Diskussion

5.4.3.2. Studie von Usiskin et al., 1999

Usiskin et al. untersuchten 47 Very-early-onset Schizophreniepatienten (COS-Patienten) auf das Vorhandensein einer Mikrodeletion 22q11.

Die Rekrutierung der jungen Patienten erfolgte am NIMH (= National Institute of Mental Health) in Bethesda, Maryland, USA über einen Rekrutierungszeitraum von acht Jahren. Der Erkrankungsbeginn lag im Alter von ≤ 12 Jahren (leider keine Angabe zur genauen Definition des Erkrankungsbeginns, wahrscheinlich definiert über psychotische, Schizophrenie-typische Symptome), die Diagnose wurde gemäß DSM III-R-Kriterien unter Verwendung klinischer strukturierter Interviews (z.B. Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children – Present and Lifetime version) durch zwei Kinderpsychiater gestellt. Der prämorbid IQ der Patienten musste > 70 sein.

Die Kontrollgruppe setzte sich aus 46 Personen zusammen, die nach Alter und Geschlecht „gematcht“ waren, und die keine persönliche oder familiäre Vorgeschichte einer schwerwiegenden psychiatrischen Erkrankung aufwiesen.

Es wurde eine FISH unter Verwendung der Cosmidprobe D22S75 (N25) durchgeführt. Auch klinische, prämorbid, physikalische und andere Auffälligkeiten wurden, blind zum Ergebnis, erfasst.

In der Studie von Usiskin et al. konnte bei drei der 47 Patienten (6.4% entsprechend) eine de novo-Mikrodeletion 22q11 ausfindig gemacht werden.

5.4.3.3. Studie von Sporn et al., 2004

Bei Sporn et al. wurden 75 Schizophreniepatienten mit einem Erkrankungsalter von < 13 Jahren untersucht.

Die COS-Patienten wurden auch hier über das NIMH rekrutiert, die Diagnose wurde gemäß DSM III-R/DSM IV-Kriterien unter Zuhilfenahme strukturierter Interviews und unter Zuhilfenahme von Beobachtungen der stationären, medikationslosen Patienten, gestellt. Auch hier war das Erkrankungsalter nicht definiert. Patienten mit bedeutenden medizinischen oder neurologischen Erkrankungen sowie Patienten mit einem IQ < 70 wurden von der Studienteilnahme ausgeschlossen.

Eine Kontrollgruppe wird nicht beschrieben.

Die Analyse erfolgte über die FISH mithilfe der Cosmidprobe D22S75. Außerdem wurde für jeden Probanden die MLPA (siehe hierzu Kapitel 5.4.1.) als Bestätigungstest angewandt.

Sporn et al. konnten bei vier der 75 COS-Patienten (5.3% entsprechend) eine 3 Mb-große Mikrodeletion 22q11 finden.

5.4.3.4. Studie von Yan et al., 1998

Hier wurden 32 COS-Patienten und 21 als „mehrdimensional beeinträchtigt“ bezeichnete Patienten untersucht.

Die COS-Patienten kamen vom NIMH und waren ursprünglich für eine Studie zum Thema atypische Antipsychotika rekrutiert worden, weshalb ein Einschlusskriterium in die Studie das Versagen einer konventionellen antipsychotischen Therapie war. Die Patienten erfüllten die DSM III-R-Kriterien für das Vorliegen einer Schizophrenie, der Beginn psychotischer Symptome lag im Alter von ≤ 12 Jahren. Patienten mit einem präpsychotischen IQ < 70 , mit somatischen/neurologischen Erkrankungen, mit einer schwerwiegenden affektiven Erkrankung und Patienten mit einem Krankheitsbeginn > 12 Jahre wurden von der Studienteilnahme ausgeschlossen.

5. Diskussion

Die MDI-Patienten (MDI = multidimensionally impaired, Psychosis Not Otherwise Specified in DSM III-R or DSM IV) wiesen eine Vorgeschichte von transienten Schizophrenieepisoden auf.

Eine Kontrollgruppe wird auch hier nicht beschrieben.

Es wurde eine FISH an EBV-transformierten B-lymphoblastoiden Zelllinien durchgeführt, und es wurden die Cosmidproben N25, sc11.1A und sc11.1B (D22S139), D0832 (D22S502) und c350 (D22S695) zusammen mit entweder D22S39 (22q13.3-Hybridisierung) oder mit der Rhodamin-markierten 22qter-Painting-Probe verwendet; es wurden mindestens 30 Mitosen mittels FISH vor einer Diagnosestellung analysiert.

Als Ergebnis wurde in der Studie von Yan et al. 1 COS-Patient mit einer de novo-Mikrodeletion 22q11.2 gefunden, was einem Anteil von 3.1% entspricht.

5.4.3.5. Weitere Prävalenzstudien

Gothelf et al., 1997 können in ihrer Mikrodeletion 22q11-Prävalenzstudie leider keine Angaben zum Erkrankungsalter ihrer Patienten machen, sondern lediglich zum Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Studiendurchführung. Unter den 15 analysierten schizophrenen Studienteilnehmern befanden sich zwei 16-jährige Patienten. Die Probanden wurden anhand von 22q11.2-Mikrodeletionssymptomen, anhand einer „VCFS Clinical Scale“ vor-ausgewählt.

Unter den 15 vor-selektierten Schizophreniepatienten konnten drei Mikrodeletion 22q11-Träger gefunden werden (entspricht 20%); ein Mikrodeletionsträger befand sich im aktuellen Alter von 16 Jahren, ein anderer war 30 Jahre alt, und zum dritten Deletionspatienten wurden keine näheren Angaben gemacht.

Wiehahn et al., 2004 geben in ihrer Studie nur das Erkrankungsalter der sechs Patienten an, die mindestens zwei klinische Mikrodeletion 22q11-Merkmale aufwiesen, bei den restlichen 79 Patienten wurden bezüglich des Krankheitsbeginns keine Angaben gemacht. Zwei der sechs erwähnten Patienten fielen in die Kategorie „juvener Erkrankungsbeginn“ (Erkrankungsalter 16 und 17 Jahre). Alle Patienten der Studie waren Schizophreniepatienten afrikanischer Herkunft.

Es wurden zwei Mikrodeletionen 22q11 unter den 85 Patienten gefunden (2.4%); ein Mikrodeletionsträger war im Alter von 16 Jahren an der Schizophrenie erkrankt.

Arinami et al., 2001 untersuchten in ihrer Studie 300 japanische Schizophreniepatienten mit einem Erkrankungsbeginn zwischen 12 und 39 Jahren (keine Angabe der genauen Altersverteilung) und fanden unter ihnen 1 Mikrodeletion 22q11-Patienten, welcher bereits mit 15 Jahren an akustischen Halluzinationen, somatischen Passivitätserfahrungen und ausgeprägten Wahnvorstellungen litt.

Die Studienteilnehmer von Karayiorgou et al., 1995 wiesen ein Erkrankungsalter von 5 – 41 Jahren auf (auch hier keine Angabe zur genauen Altersverteilung). Zwei von 695 schizophrenen, schizoaffektiven oder schizophreniformen Patienten zeigten die Mikrodeletion; leider sind die Mikrodeletions-Träger und deren Krankheitsbeginn nicht näher beschrieben.

5.4.3.6. Mikrodeletion 22q11 in CNV-Studien

Auch anhand von aktuellen CNV-Studien (zu den CNV-Studien siehe auch Kapitel 5.6.1.) kann die Prävalenz der Mikrodeletion 22q11.2 bei schizophrenen Patienten versus gesunden Kontrollen eingeschätzt werden. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass es (noch) keine CNV-Studie gibt, die aus-

5. Diskussion

schließlich oder überwiegend an jung-erkrankten Schizophreniepatienten durchgeführt worden wäre.

5.4.3.7. Beurteilung des eigenen Ergebnisses im Kontext und Ideen für künftige Forschungsansätze

Am besten lässt sich die Studie dieser Dissertation mit der Studie von Ivanov et al. von 2003 vergleichen.

In der Studie von Ivanov et al., 2003 geht es ebenfalls um die Analyse psychotischer Patienten, die in einem Alter von < 18 Jahren erkrankten. Usiskin et al., 1999, Sporn et al., 2004 und Yan et al., 1998 untersuchten hingegen ausschließlich sehr jung erkrankte Schizophreniepatienten von \leq 12 Jahren. Sowohl in die hier vorliegende Arbeit als auch in die Ivanov-Studie wurden neben schizophrenen Patienten auch psychotische Patienten mit einer bipolaren oder einer schizoaffectiven Psychose einbezogen, der Anteil dieser Nicht-Schizophreniepatienten ist hier jedoch geringer (6 versus 51 bipolare/schizoaffective Patienten). Auch die Anzahl der juvenilen Schizophreniepatienten ist bei Ivanov et al., 2003 größer als in der vorliegenden Dissertation (103 versus 141 juvenile Schizophreniepatienten). Das durchschnittliche Erkrankungsalter der juvenilen Patienten liegt bei Ivanov et al., 2003 bei 15,59 Jahren (7 – 17 Jahre), in der vorliegenden Dissertation bei 14,86 Jahren (7 – 18 Jahre). Bei Ivanov et al., 2003 ist das Geschlechterverhältnis der juvenilen Patienten ausgeglichen, wohingegen in der Dissertation 82 Probanden männlich und nur 27 Patienten weiblich waren. In der Dissertationsstudie war der Erkrankungsbeginn v.a. (siehe hierzu Kapitel 5.1.) definiert als der Beginn von Prodromalsymptomen, wohingegen Ivanov et al., 2003 den Erkrankungsbeginn als das erste Auftreten von Wahnvorstellungen, Halluzinationen oder einer Manie festsetzten. Bei beiden Studien wurden die Informationen aus den Krankenunterlagen um Erkenntnisse aus einem klinischen Interview ergänzt, bei Ivanov et al., 2003 war dies eine verkürzte Form des SCAN-Interviews und in der hier vorliegenden Studie ein SKID I- und PANSS-Interview. Die Diagnosestellung erfolgte jeweils nach DSM IV. Bei Ivanov et al., 2003 wurden Probanden mit einem IQ < 70 von der Studienteilnahme ausgeschlossen (hier nicht der Fall), dafür wurden Patienten mit bestimmten physischen Erkrankungen nicht explizit ausgenommen (wie es hier der Fall war).

In der vorliegenden Dissertation und in der Studie von Ivanov et al., 2003 wurden unterschiedliche Methoden der Mikrodeletions-Detektion verwendet: Ivanov et al., 2003 wandten fünf Mikrosatellitenmarker und einen SNP an, mit der Verifizierung eines positiven Ergebnisses durch eine semi-quantitative PCR, und in der Dissertation kam die FISH unter Zuhilfenahme der FISH-Sonde TUPLE 1 zum Einsatz. Bei beiden Methoden handelt es sich um gängige Methoden der Mikrodeletions-Detektion, allerdings gilt die FISH als zuverlässiger und ist (im Gegensatz zur SNP-Analyse) für die Diagnostik zugelassen.

Wie in der hier vorliegenden Arbeit konnten auch Ivanov et al., 2003 keinen juvenilen psychotischen Patienten mit einer Mikrodeletion 22q11.2 finden. Ivanov et al., 2003 fanden jedoch 1 Mikrodeletions-Träger in ihrer „adulten“ Schizophreniegruppe, über dessen Erkrankungsbeginn keine Krankenhausaufzeichnungen vorlagen, der jedoch nach eigenen Angaben im Alter von 17 Jahren die ersten Krankheitssignale entwickelt habe.

Der Vergleich unserer Studie mit den anderen, in den Kapiteln 5.4.3.2., 5.4.3.3. und 5.4.3.4. beschriebenen Studien ist schwierig, da in den Studien von Usiskin et al., 1999, Sporn et al., 2004 und Yan et al., 1998 lediglich sehr jung-erkrankte Schizophreniepatienten von \leq 12 Jahren untersucht wurden. Nur 11% unserer Probanden würden diesen Kriterien entsprechen.

5. Diskussion

Es ist durchaus möglich und denkbar – und das ähnlich hohe Studienergebnis von Usiskin et al. und Sporn et al. (6.4% bzw. 5.3% Mikrodeletion 22q11.2-Träger) würde dafür sprechen –, dass die Mikrodeletion 22q11.2-Prävalenzrate bei den besonders jung-erkrankten, d.h. bei den COS-Patienten, doch um Einiges höher liegt als bei den juvenilen, unter 18-jährigen und als bei den adulten Schizophreniepatienten; dies könnte wiederum bedeuten, dass die Mikrodeletion 22q11.2 mit einem besonders frühen Schizophrenie-Erkrankungsalter assoziiert ist. Man muss jedoch einschränkend sagen, dass die Fallzahlen beider Studien zu gering sind, um allgemein-gültige Aussagen zu treffen und Folgerungen daraus zu ziehen. Auch bei Yan et al., 1998 ist die Patientenzahl sehr gering, und es wird nur eine spezielle Subpopulation von COS-Patienten untersucht, bei denen die Therapie mit konventionellen Antipsychotika keinen Erfolg gezeigt hatte. Dies könnte die bei Yan et al., 1998 gefundene Mikrodeletion 22q11.2-Prävalenzrate von 3.1% für die COS-Patienten höher erscheinen lassen als sie tatsächlich ist, wenn Mikrodeletion 22q11.2-Patienten generell schlechter auf die konventionellen Medikamente ansprechen.

Zusammenfassend lässt sich anhand der vorliegenden Dissertationsstudie – und auch anhand der Studie von Ivanov et al., 2003 schlussfolgern, dass die Prävalenzrate der Mikrodeletion 22q11.2 unter juvenil-erkrankten schizophrenen Patienten zumindest nicht höher zu sein scheint als die Prävalenzrate bei adulten Schizophreniepatienten. Die Prävalenz scheint auch dann nicht höher zu sein, wenn Probanden mit einem niedrigen IQ nicht explizit von der Studienteilnahme ausgeschlossen werden; dies war eine Vermutung von Ivanov et al., 2003, die Prävalenzrate würde steigen, würde man Patienten mit einem niedrigen IQ mit in die Studie aufnehmen. Für das eigene Ergebnis spricht auch, dass bei jungen 22q11.2-Mikrodeletionspatienten für gewöhnlich keine erhöhte Rate an Schizophrenien berichtet wird, sondern nur bei adulten Patienten (siehe Kapitel 1.7.3.2. der Einleitung). Angesichts der Tatsache, dass Prävalenzstudien mit einem niedrigen Prävalenzergebnis weniger wahrscheinlich publiziert werden als dies für Studien mit einem hoch-auffälligen Ergebnis der Fall ist (sogenannter Publikations-Bias; so auch Ivanov et al., 2003), ist es sehr wahrscheinlich, dass die von Usiskin et al., 1999, Sporn et al., 2004 und Yan et al. berichteten Prävalenzraten bei jungen Schizophreniepatienten zu hoch angesetzt sind.

Auffällig beim Lesen der im Kapitel 5.4.3.5. kurz beschriebenen Studien war jedoch, dass Einige der in diesen Studien gefundenen Mikrodeletions-Träger bereits in juvenilem Alter an der Schizophrenie erkrankten. Es ist möglich, dass die Prävalenzrate der Mikrodeletion 22q11.2 bei juvenilen Patienten tatsächlich höher liegt als bisher gefunden und angenommen. Einige juvenile 22q11.2-Mikrodeletionspatienten wurden in Studien möglicherweise in die Kategorie des adulten Schizophreniebeginns klassifiziert, da frühe Symptome der Schizophrenie, wie z.B. bestimmte Prodromalsymptome oder auch schon psychotische Symptome nicht erkannt bzw. fehlgedeutet werden. In diesem Zusammenhang soll hier auch nochmal darauf hingewiesen werden, dass der Erkrankungsbeginn in dieser Dissertation definiert war als das erste Auftreten prodromaler Symptome, wohingegen in den anderen Prävalenzstudien eher das erste Auftreten tatsächlich psychotischer Symptome für die Bestimmung des Krankheitsbeginns maßgeblich war. So würden die in unserer Studie als juvenil definierten Patienten in den anderen Studien wohl eher als adult definiert worden sein, was den Vergleich der Prävalenzen ebenfalls erschwert.

Wichtig für eine genauere Einschätzung der tatsächlichen Mikrodeletion 22q11.2-Prävalenz bei juvenilen Schizophreniepatienten wäre die Durchführung von Prävalenzstudien an einer größeren Patientengruppe – vielleicht auch die Gegenüberstellung juveniler und COS-Patienten –, was jedoch schwierig ist, da diese jung-erkrankten Patienten selten sind und die Sammlung eines großen Patientenkollektivs, v.a. mit gleichen Rekrutierungs- sowie Ein- und Ausschlusskriterien, somit eine Herausforderung darstellt. Vielleicht wäre eine Möglichkeit, an ein größeres Patientenkollektiv zu

5. Diskussion

kommen, die Mit-Einbeziehung auch bipolarer und schizoaffectiver Patienten oder auch die Mit-Einbeziehung von Patienten mit noch anderen Störungen der neuronalen Entwicklung („neurodevelopmental disorders“), für die ja eine gemeinsame genetische Basis mit der Schizophrenie angenommen und vermutet wird. Auch die Durchführung von CNV-Studien an juvenilerkrankten Patienten stellt eine Möglichkeit dar, bisherige Studienergebnisse an einer größeren Patientenpopulation zu validieren. Wichtig in Zukunft wird auch sein, den Erkrankungsbeginn einheitlich zu definieren.

Das Interesse an der Mikrodeletion 22q11.2 als „genetischem Subtyp der Schizophrenie“ ist in der Forschung nach wie vor groß und ungebrochen. Es konnte bisher keine andere genetische Veränderung gefunden werden, die mit einem ähnlich großen – geschweige denn mit einem größeren – Risiko der Schizophrenieentstehung assoziiert wäre. Die hier dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Mikrodeletion 22q11.2 nicht mit einem frühen Krankheitsbeginn assoziiert ist. Bei der adulten Form der Schizophrenie wurde ihre Rolle als Suszeptibilitätsfaktor jedoch in verschiedenen Studien belegt. Aufgabe in Zukunft wird sein, herauszufinden, wie die im Deletionsbereich gelegenen Gene (und durch welche molekularen Mechanismen), letztendlich zum Krankheitsbild der Schizophrenie führen. Ansatzpunkte könnten hier verschiedene Endophänotypen/intermediäre Phänotypen wie z.B. kognitive Defizite, Tierversuche und induzierte pluripotente Stammzellen iPSCs (z.B. Saporta et al., 2011) sein. Auch ohne Mikrodeletion könnten Varianten (z.B. SNPs) in diesen Genen des Mikrodeletionsbereichs zur Pathogenese von Schizophrenien beitragen. Für einige dieser Gene gibt es in der Literatur bereits Hinweise auf eine solche Rolle (siehe hierzu auch das Kapitel 1.7.3.3.). Diese Hypothese könnte beispielsweise in zusätzlichen Assoziationsstudien eingehender überprüft werden.

5.5. ADNFLE-Mutation *CHRNA4-776ins3*

5.5.1. Diskussion der Methode

Die *CHRNA4-776ins3*-Analyse erfolgte mithilfe eines Restriktionsenzymverdaus. Aufwändig war die Suche nach dem am besten geeigneten Restriktionsenzym inklusive die Auswahl der passenden (Mutagenese-)Primer, sowie die Etablierung der Bedingungen für die dem Verdau vorausgehende PCR.

Auch die im Folgenden kurz beschriebenen, ebenfalls auf der PCR basierenden Methoden hätten für die Genanalyse zur Anwendung kommen können; diese Methoden wären z.T. jedoch nicht spezifisch für genau die *CHRNA4-776ins3*-Detektion gewesen, und hätten im Falle von Auffälligkeiten zur Spezifizierung die Sequenzierung erforderlich gemacht (Sunnucks et al., 2000).

Neben der qualitativen PCR gibt es mittlerweile die quantitative oder Echtzeit-PCR, auf die in diesem Kapitel ebenfalls kurz eingegangen werden soll.

Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis (SSCP):

(aus Wallace, 2002)

Die SSCP-Technik beruht auf der Eigenschaft von Einzelstrang-DNA (hitzenaturierte, PCR-amplifizierte DNA) unter nicht-denaturierenden Bedingungen eine dreidimensionale Sekundärstruktur anzunehmen, die v.a. abhängig von der DNA-Sequenz ist. Folglich können Sequenzveränderungen der DNA infolge eines Polymorphismus oder einer Mutation zu einer veränderten Sekundärstruktur führen. In der Elektrophorese bewirkt diese veränderte Sekundärstruktur ein verändertes DNA-Laufverhalten.

5. Diskussion

Heteroduplex-Analyse:

(<https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/heteroduplex-analysis>)

Die Doppelstrang-DNA ist kein gerader, starrer Stab. Sequenzvariationen können Krümmungen in der Doppelhelix verursachen oder sogar die Basisstruktur der Helix verändern. Eine Krümmung oder ein Knick in der DNA schränkt die Mobilität der DNA durch eine Filtermatrix ein, das gekrümmte Molekül erscheint für die Gelporen größer. Ein Mismatch zwischen zwei, die Duplex bildenden DNA-Strängen kann einen radikaleren Knick in der DNA-Struktur nach sich ziehen und bringt eine Heteroduplex hervor, die mittels Elektrophorese leicht von der Homoduplex unterschieden werden kann. Für die Technik der Heteroduplex-Analyse wird Kontroll-DNA denaturiert, und es erfolgt ein Annealing mit ebenfalls denaturierter, zu untersuchender DNA.

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) und Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE):

(aus Muyzer/Smalla, 1998; Roelfsema/Peters, 2005)

Die Unterscheidung von DNA-Fragmenten gleicher Länge, jedoch mit einer unterschiedlichen Sequenz erfolgt anhand einer verminderten elektrophoretischen Mobilität der Heteroduplexe im Vergleich zu den Homoduplexen in einem Gel, das einen linearen DNA-Denaturierungs- respektive einen DNA-Temperaturgradienten aufweist.

Next generation sequencing:

Da in aktuellerer Zeit (und nach der Konzeptionierung dieser Dissertation) viele neue und kostengünstige Sequenzierungstechniken (next generation sequencing) auf den Markt gekommen sind, würden diese die doch vergleichsweise aufwändige Methode des Restriktionsenzymverdaus heute wahrscheinlich ablösen. Auch hätten diese Methoden den Vorteil, dass sie Informationen über das gesamte *CHRNA4*-Gen liefern würden. Dadurch könnte zusätzlich nach bisher unbekannten Mutationen in diesem Gen gesucht werden.

Quantitative oder Echtzeit-PCR:

Die Echtzeit-PCR ermöglicht die Quantifizierung und Analyse der eingesetzten DNA-Moleküle (Gibson, 2006). Kleine DNA-Sequenzvariationen wie SNPs oder somatische Mutationen werden bereits während der PCR selber, d.h. in Echtzeit, vom sogenannten LightCycler detektiert; eine sich der PCR anschließende zweite Analyseverfahren wie beispielsweise ein Restriktionsenzymverdaus, eine SSCP oder eine Sequenzierung ist hier nicht mehr erforderlich (Gibson, 2006). Die Echtzeit-PCR bietet einfache und voll-automatisierte Arbeitsabläufe, gleichzeitig erfolgt die Kontrolle einer potenziellen PCR-Kontamination (Gibson, 2006).

Für die Echtzeit-PCR werden Fluoreszenz-Technologien verwendet, um zwischen den verschiedenen Allelausprägungen eines Polymorphismus/einer Mutation unterscheiden zu können (Gibson, 2006). In diesem Zusammenhang spielt der sogenannte FRET (= Fluorescence resonance energy transfer) eine große Rolle. Hierbei handelt es sich um ein Quanten-Phänomen, das zwischen zwei Farbstoffmolekülen stattfindet (Didenko, 2001). Die Erregung wird durch eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung und ohne die Emission eines Photons von einem Donor- auf ein Akzeptor-Fluorophor übertragen (Didenko, 2001). In der Folge wird die Fluoreszenz des Donormoleküls gelöscht und der Akzeptor wird angeregt (Didenko, 2001).

Bei der Echtzeit-PCR findet der FRET z.B. statt, wenn zwei fluoreszenzmarkierte (ein Donor- und ein Akzeptor-Fluorophor), allelspezifische Oligonukleotid-Sonden während der PCR nebeneinander auf der Ziel-DNA binden/hybridisieren (Bianchi et al., 2010; Didenko, 2001; Gibson, 2006). Im LightCycler-Gerät kann dann die Schmelztemperatur des Matrizen-Sonden-Komplexes über ein steiles Abfallen der Fluoreszenz ermittelt werden, und so eine ggf. vorhandene Mutation durch eine

5. Diskussion

von der Normvariante abweichende Schmelztemperaturkurve detektiert werden (Bianchi et al., 2010; Didenko, 2001; Gibson, 2006).

Auch die sogenannte TaqMan-Methode^R basiert mittlerweile auf der FRET (Didenko, 2001). Hier wird die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq* DNA-Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) verwendet, um die laufende Reaktion zu überwachen (Didenko, 2001). Die *Taq*-Polymerase spaltet ein an beiden Enden fluoreszenzmarkiertes und zur Ziel-DNA komplementäres Oligonukleotid, so dass sich das Donor-Fluorophor vom Akzeptor entfernt und die Fluoreszenz des Donors zu-, die des Akzeptors/Quenchers abnimmt (Didenko, 2001; Gibson, 2006). Es wird je eine Sonde mit unterschiedlichem Fluoreszenzfarbstoff für die „Wildtyp“-DNA und die mutierte DNA verwendet (Gibson, 2006).

5.5.2. Eigenes Ergebnis

Bei keinem der getesteten Probanden konnte in dieser Dissertation eine *CHRNA4-776ins3*-Mutation nachgewiesen werden. Diese Mutation ist somit sehr wahrscheinlich keine häufige Ursache der juvenilen Schizophrenie.

In der Literatur gibt es bisher keine Studie, die Gleiches untersucht hätte; da die Hinweise – trotz des hier gefundenen negativen Ergebnisses – für eine möglicherweise doch bestehende Assoziation zwischen der ADNFLE bzw. dem nikotinischen System und der Schizophrenie jedoch bestechend sind, soll hier noch einmal auf diese Hinweise eingegangen werden.

5.5.3. Hinweise in der Literatur für einen ursächlichen Zusammenhang von Schizophrenie, Epilepsie (ADNFLE) und nikotinischem System

5.5.3.1. Epilepsie und Schizophrenie

Bereits seit vielen Jahren besteht großes Interesse an der Beziehung Schizophrenie – Epilepsie, und bereits Kraepelin vermerkte 1919 „As in dementia praecox epileptiform seizures occur, the malady may be taken for epilepsy...“ In mehreren Studien hat man herausgefunden, dass Individuen mit einer Epilepsie ein erhöhtes Risiko dafür haben, psychotische Symptome aufzuweisen, welche der Schizophrenie ähnlich sein können (Cascella et al., 2009). Kontrovers diskutiert und weniger gut erforscht ist, ob umgekehrt die Schizophrenie ein Risikofaktor für das Auftreten einer Epilepsie ist (Cascella et al., 2009).

Die Raten einer „unklassifizierten“ Psychose liegen bei Patienten mit komplex-fokalen Anfällen zwischen 7 und 25% (Gibbs/Gibbs, 1952; Matsuura et al., 2003) und zwischen 2.4 und 9.4% wenn sowohl komplex-fokale als auch generalisierte Anfälle berücksichtigt werden, was vermuten lässt, dass generalisierte Anfälle die Stärke der Assoziation vermindern (Cascella et al., 2009; Bruens, 1971). Prävalenzraten speziell der Schizophrenie in einer klinisch gemischten Epilepsiepopulation (d.h. fokale und generalisierte Formen) schwanken zwischen 0.8 und 70% unter Verwendung unstrukturierter klinischer Interviews (Slater et al., 1963), betragen 9.25% unter Verwendung von DSM III-Kriterien (Mendez et al., 1993) und 50% in einer Patientenstudie basierend auf den Present State Examination-Kriterien (Perez/Trimble, 1980) (Cascella et al., 2009). In einer aktuelleren Studie von Matsuura et al., 2004 konnte eine Prävalenzrate für Schizophrenie von 9 bis 52% gefunden werden (Operational Criteria Checklist for Psychotic Illness), und in einer Studie an 87 Kindern mit

5. Diskussion

einer Temporallappenepilepsie entwickelten 10% im 10-jährigen Beobachtungszeitraum eine schizophreniforme Psychose (Lindsay et al., 1979).

Das Auftreten Schizophrenie-ähnlicher Symptome bei Epilepsiepatienten wird oft als SLPE = Schizophrenia-Like Psychosis of Epilepsy bezeichnet, und bis heute ist nicht ganz klar, ob es sich bei der SLPE und der Schizophrenie um zwei verschiedene Krankheitsbilder oder um ein und dieselbe Krankheitsentität handelt (Cascella et al., 2009). Bei Patienten mit SLPE soll die affektive Schwingungsfähigkeit und Persönlichkeit erhalten sein (Slater et al., 1963), die Patienten zeigen wohl nicht den sonst typischen „schizophrenen Verfall“ (Magnusson et al., 2003), es soll selten(er) zu Negativsymptomen kommen (jedoch gibt es auch Patienten mit in erster Linie Negativsymptomen (Cascella et al., 2009); siehe hierzu auch die *CHRNA4-776ins3*-Familie) und schizotype prämorbid Persönllichkeitszüge sollen fehlen (Slater et al., 1963). Die meist vorhandenen Positivsymptome sollen von der Schizophrenie jedoch nicht unterscheidbar sein (Slater et al., 1963), und manche Studien konnten die von Slater gefundenen Unterschiede zwischen der SLPE und der Schizophrenie nicht bestätigen (Oyeboode/Davison, 1989; Kanemoto et al., 2001; Getz et al., 2002).

Die meisten Studien haben herausgefunden, dass die SLPE v.a. mit der Temporallappenepilepsie (TLE) assoziiert ist bzw. dass ca. 76% der Epilepsiepatienten mit einer Psychose an einer TLE leiden (Trimble et al., 2000). Es gibt wenige Untersuchungen der Psychopathologie von Patienten, bei denen die SLPE auf dem Boden einer FLE entstanden ist (Cascella et al., 2009; Adachi et al., 2000). Neben temporalen (und hier v.a. limbischen) Strukturen als Hauptverantwortlichkeitsfaktoren für die Entstehung einer Psychose bei Epilepsiepatienten spielen auch frontale und parietale Strukturen (Oyeboode, 2008) sowie generalisierte kognitive Beeinträchtigungen (Mellers et al., 2000) eine Rolle.

Noch nicht ganz geklärt ist der ursächliche Zusammenhang zwischen der Epilepsie und der Schizophrenie, und es wird zwischen zwei möglichen pathophysiologischen Mechanismen unterschieden (nach Sachdev, 1998): 1. die Psychose entsteht auf dem Boden der wiederholten elektrischen Entladungen im Gehirn bei einer epileptischen Erkrankung, entweder direkt oder durch neurophysiologische oder neurochemische Veränderungen; für diese Hypothese spricht, dass die Wahrscheinlichkeit eines Epilepsiepatienten eine Psychose zu entwickeln größer ist, je früher die epileptische Erkrankung begonnen hat und je therapieresistenter und häufiger die Anfälle sind; außerdem liegt zwischen dem epileptischen und dem schizophrenen Erkrankungsbeginn eine „Latenzzeit“ von mehreren Jahren. Die 2. Möglichkeit des ursächlichen Zusammenhangs zwischen Epilepsie und Schizophrenie könnte das Vorliegen einer gemeinsamen Neuropathologie und auch einer gemeinsamen genetischen Grundlage sein. Für die 2. Hypothese spricht z.B. eine Studie von Qin et al., 2005: die Autoren fanden heraus, dass eine positive Familienanamnese für Epilepsie das Risiko für die Entwicklung einer Schizophrenie oder einer schizophreniformen Störung erhöht, und zwar auch noch nach der Adjustierung der Effekte einer eigenen Epilepsie-Vorgeschichte. Den beiden Krankheiten Schizophrenie und Epilepsie könnte eine Entwicklungsstörung des Gehirns gemeinsam sein, wofür spricht, dass bei SLPE-Patienten im Vergleich zu Epilepsiepatienten ohne Psychose mehr „artfremdes Gehirngewebe“ (gemeint sind v.a. Hamartome und fokale Dysplasien) gefunden werden kann (Taylor, 1975). Beide Mechanismen könnten auch zusammenspielen, indem die gemeinsame Ätiologie/Neuropathologie der Hauptfaktor für die Assoziation der Epilepsie und Schizophrenie ist, und Veränderungen im Gehirn infolge wiederholter epileptischer Aktivität diesen Zusammenhang dann verstärken (Sachdev, 1998). Die möglichen Einflüsse von z.B. psychosozialen Faktoren bei Epilepsiepatienten (Chronizität, Stigmatisierung) oder einer Neurotoxizität antiepileptischer Medikamente scheinen laut Sachdev, 1998 eher zweitrangig zu sein.

5. Diskussion

5.5.3.2. *ADNFLE, Schizophrenie und kognitive Auffälligkeiten*

Die *CHRNA4*-776ins3-Mutation wurde bisher nur bei einer einzigen ADNFLE-Familie gefunden. Daher kann es sein, dass die in dieser Familie beobachtete Häufung schizophrener Auffälligkeiten auf den der Familie gemeinsamen genetischen Hintergrund – eventuell auch in Kombination mit gemeinsamen Umweltfaktoren – zurückzuführen ist, und dass die Assoziation der *CHRNA4*-776ins3-Mutation mit schizophrenen Auffälligkeiten in dieser Familie zufällig ist (Magnusson et al., 2003). Denkbar wäre, dass es in dieser Familie eine zweite Mutation gibt, die mit der ADNFLE gekoppelt vererbt wird (Steinlein et al., 2012). Aufgrund der Komplexität des Drei-Generationen-Stammbaums ist eine solche Kosegregation allerdings eher unwahrscheinlich. Weiterhin ist es möglich, dass die schizophrenen Auffälligkeiten, wie im vorigen Kapitel diskutiert, Folge wiederholter epileptischer Entladungen im Gehirn sind. Gegen letztere Erklärung spricht, dass bei den ADNFLE-Patienten aus anderen Familien und mit anderen Mutationen keine Überrepräsentation psychotischer Auffälligkeiten gefunden werden können (Magnusson et al., 2003; Steinlein et al., 2012), und dass bei anderen fokalen Epilepsieformen weniger psychiatrische Auffälligkeiten und Verhaltensauffälligkeiten nachweisbar sind als bei der ADNFLE (Magnusson et al., 2003; Picard et al., 2000).

Hingewiesen werden soll darauf, dass bei ADNFLE-Patienten mit der *CHRNA4*-S252L- oder *CHRNA2*-I312M-Mutation, wenngleich keine schizophrenen Auffälligkeiten, so doch eine Häufung kognitiver Auffälligkeiten gefunden werden kann, mit einer milden bis moderaten mentalen Retardierung respektive mit auffälligen Gedächtnisdefiziten (siehe Abb. 52 im Anhang). Die dokumentierten Fallzahlen sind jedoch aufgrund der Seltenheit der ADNFLE noch immer gering, und systematische neuropsychologische Testungen von ADNFLE-Patienten sind ausstehend (Steinlein et al., 2012). Das veränderte Schlafmuster der ADNFLE-Patienten mit einem bisweilen chronischen Schlafmangel aufgrund der Cluster von nächtlichen epileptischen Anfällen scheint für das Auftreten der kognitiven Defizite eher nicht verantwortlich zu sein, da bei der ADNFLE nicht der tiefe und nicht der REM-Schlaf, sondern normalerweise nur der leichte Schlaf durch die Anfälle gestört ist (Ryvlin et al., 2006). Auch die Dosis und Anzahl verwendeter Medikamente ist eher nicht ursächlich (Steinlein et al., 2012). Laut Steinlein et al. ist zusammengefasst eine kausale Verbindung zwischen den neurologischen und den psychiatrischen Symptomen und der jeweiligen ADNFLE-Mutation die wahrscheinlichste Erklärung für deren gemeinsames Auftreten (Steinlein et al., 2012).

5.5.3.3. *Schizophrenie und nikotinisches System*

In diesem Kapitel werden ein paar Punkte genannt, die die Hypothese eines ursächlichen Zusammenhangs zwischen nAChR-Mutationen und der Entwicklung einer Schizophrenie weiter unterstützen. Diese Punkte machen deutlich, dass das nikotinische System bei der Schizophrenie – und hier insbesondere bei der der Schizophrenie zugrunde liegenden gestörten sensorischen Reizverarbeitung und der deutlich beeinträchtigten Kognition – eine wichtige und entscheidende Rolle spielt.

Viele kognitive Abläufe basieren auf dem Vorhandensein intakter nAChRs im Gehirn, die in unterschiedlichen zerebralen Bahnen lokalisiert sind (Ochoa/Lasalde-Dominicci, 2007). Die Demenz vom Alzheimer-Typ ist ein Beispiel für die Korrelation zwischen schweren kognitiven Beeinträchtigungen und einer gestörten Funktion neuronaler nAChRs (Perry et al., 2000). Auch schizophrene Patienten weisen kognitive Probleme auf, sie betreffen hier die Bereiche verbales/visuelles Lernen und Gedächtnis, Aufmerksamkeit, Verarbeitungsgeschwindigkeit, Problemlösung, soziale Kognition und Arbeitsgedächtnis (Nuechterlein et al., 2004). Beteiligt an diesen kognitiven Leistungen sind vor allem die hoch-affinen, heteromeren $\alpha 4\beta 2$ - und die niedrig-affinen, homomeren $\alpha 7$ -nAChRs. Postmortem kann im Gehirn schizophrener Patienten eine verminderte Expression von $\alpha 7$ -nAChRs

5. Diskussion

in verschiedenen Hirnregionen nachgewiesen werden (Court et al., 1999; Freedman et al., 1995; Guan et al., 1999; Olincy/Stevens, 2007), und autoradiografische Studien zeigen eine verminderte Anzahl an $\alpha 4\beta 2$ -nAChRs im Hippocampus, Kortex und Striatum (Breese et al., 2000; Durany et al., 2000).

Daneben zeigen viele Schizophrenie-Kopplungsstudien in verschiedenen ethnischen Bevölkerungsgruppen eine positive Kopplung der Schizophrenie mit der Chromosomenregion 15q13-14, wobei dem in dieser Region gelegenen Kandidatengen *CHRNA7*, welches für die $\alpha 7$ -Untereinheit des neuronalen nAChRs kodiert, die größte Aufmerksamkeit gilt (Leonard/Freedman, 2006). In diesem Gen sind v.a. Polymorphismen in der Promotorregion mit der Schizophrenie assoziiert (Leonard/Freedman, 2006), und der Marker D15S1360 in Intron 4 des *CHRNA7*-Gens ist bei schizophrenen Patienten mit dem Rauchen assoziiert (De Luca et al., 2004). *CHRNA7* spielt eine wichtige Rolle bei der P50-auditiven evozierten Potenzialantwort (Freedman et al., 2000), welche bei Schizophreniepatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nicht inhibiert ist, und somit eine fehlende Filterung in der sensorischen Reizverarbeitung bei diesen Patienten widerspiegelt.

Ein weiterer wichtiger Punkt für die Verbindung des nikotinischen Systems und der Schizophrenie ist folgender: 60 – 80% der Schizophreniepatienten sind Raucher verglichen mit einem Raucheranteil von ca. 35 – 54% bei Individuen mit anderen psychiatrischen Erkrankungen und 25% in der Allgemeinbevölkerung (Ripoli et al., 2004; Leonard et al., 2001; Hugues et al., 1986). Diejenigen Schizophreniepatienten, die rauchen, sind meist starke Raucher (> 30 Zigaretten pro Tag); sie inhalieren den Zigarettenrauch tiefer, um mehr Nikotin pro Zigarette aufzunehmen (De Leon et al., 2002; Olincy et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass Nikotin die bei schizophrenen Patienten beeinträchtigte sensorische Reizverarbeitung vorübergehend normalisieren und bestimmte kognitive Defizite wie z.B. die beeinträchtigte Aufmerksamkeits- und Gedächtnisleistung verbessern kann (Stephens et al., 2009; D'Souza/Markou, 2012). Der Nikotinkonsum vieler Schizophreniepatienten scheint daher eine Art „Selbstmedikation“ zu sein, oder es gibt eine gemeinsame genetische Vulnerabilität/gemeinsame Risikofaktoren für Schizophrenie und Nikotinabhängigkeit (D'Souza/Markou, 2012; Adler et al., 1998; Dome et al., 2010; Khantzian, 1985; Leonard et al., 2001, 1998; Markou et al., 1998; Chambers et al., 2001; Leonard/Freedman, 2006).

In der Literatur konnten zwei Studien gefunden werden, die bei Schizophreniepatienten verschiedene *CHRNA4*- und *CHRNA2*-Polymorphismen untersucht haben:

De Luca et al., 2006 stellten Untersuchungen bei 117 kanadischen Familien mit jeweils mindestens 1 schizophrenen Patienten in der Familie an. Sie fanden heraus, dass die beiden nikotinischen Gene *CHRNA4* und *CHRNA2* miteinander interagieren, um in Kombination die Schizophrenieanfälligkeit zu erhöhen, wohingegen keines der Gene für sich genommen eine Suszeptibilität für Schizophrenie vermitteln konnte. Einschränkend ist zu sagen, dass lediglich sieben SNPs untersucht wurden und die Studienpopulation nach der Stratifikation sehr klein war.

Kishi et al., 2008 analysierten 738 Schizophreniepatienten und 753 Kontrollpersonen aus der japanischen Bevölkerung auf das Vorhandensein von 13 SNPs in *CHRNA4* und *CHRNA2*. Es konnte keine signifikante Assoziation in der Allel-/Genotyp-Analyse oder in der Haplotyp-Analyse gefunden werden. Auch eine Gen-Gen-Interaktion konnte hier nicht nachgewiesen werden. Ein Mutationscan zur Detektion seltener Genvarianten mit funktionellen Effekten wurde nicht durchgeführt.

5. Diskussion

5.5.4. Ausblick

In den vorigen Kapiteln wurde besprochen, dass es einige Verbindungen zwischen Epilepsie bzw. ADNFLE und Schizophrenie einerseits und Schizophrenie und nikotinischem System andererseits gibt. Das Untersuchungsergebnis der vorliegenden Dissertationsstudie, die ADNFLE betreffend, war negativ, d.h. es konnte hier bei juvenilen nicht-vorselektionierten Schizophreniepatienten keine *CHRNA4*-776ins3-Mutation gefunden werden. Es wäre jedoch interessant und aufgrund der in Kapitel 5.5.3. gemachten Ausführungen auch sehr vielversprechend, zu untersuchen, ob bei bestimmten vorselektionierten schizophrenen Patienten *CHRNA4*-776ins3-Mutationsträger gefunden werden können. Hierfür kämen z.B. solche Schizophreniepatienten infrage, die entweder bereits mit einer nächtlichen Frontallappenepilepsie diagnostiziert wurden (wohl sehr selten der Fall), oder die selbst oder deren Familienmitglieder einen besonders ruhelosen Schlaf haben oder gar zum Schlafwandeln neigen (schwierige ADNFLE-Diagnose, siehe Kapitel 1.7.4.1. in der Einleitung) (Magnusson et al., 2003). Außerdem kommen solche Schizophreniepatienten für weitere Untersuchungen infrage, deren Klinik der der SLPE ähnelt (Magnusson et al., 2003), mit z.B. relativ wenigen prämorbidem Auffälligkeiten oder einer relativ gut erhaltenen affektiven Schwingungsfähigkeit (zur SLPE siehe Kapitel 5.5.3.1.). Auch schizophrene Patienten, die wie die bekannten norwegischen 776ins3-Träger in erster Linie eine Apathie, einen Mangel an Initiative, relativ wenige Positivsymptome und ein schlechtes Ansprechen auf antipsychotische Medikamente aufweisen, deren emotionale Wärme jedoch erhalten ist und die eine geringe kognitive Verschlechterung zeigen, wären gute Kandidaten für weitere Assoziationsstudien (Magnusson et al., 2003). Interessant wäre es auch, die schizophrenen Patienten nicht nur auf die *CHRNA4*-776ins3-Mutation zu untersuchen, sondern auch auf die anderen bekannten nAChR-Mutationen, insbesondere auch auf die *CHRNA4*-S252L- und die *CHRNA2*-I312M-Mutation, welche mit kognitiven Auffälligkeiten einhergehen. Optimal wäre es, wenn größere Patientenkollektive vorhanden wären, in welchen sämtliche nAChR-Gene komplett sequenziert werden könnten, um alle genetischen Varianten zu erfassen. Im Zeitraum, in den der praktische Teil dieser Dissertation fiel, war ein solches Vorgehen noch viel zu teuer und zeitaufwändig. Inzwischen stehen jedoch unterschiedliche Methoden des next generation sequencing zur Verfügung, welche ein solches Vorgehen ermöglichen würden.

Wichtig für weitere Forschungen auf dem Gebiet der ADNFLE und der Schizophrenie wäre die systematische neuropsychologische Evaluation der (AD)NFLE-Patienten mit nachgewiesenen (nAChR-)Mutationen, wofür jedoch auch die Identifikation neuer Patienten und Familien mit dieser Erkrankung nötig sein wird, um ein ausreichend großes Studienkollektiv zu erhalten.

5.6. Genetik und Schizophrenie

5.6.1. Einordnung in den Gesamtzusammenhang: neuere Forschungsmethoden

In der Zeit zwischen der Konzeptionierung und der Fertigstellung dieser Dissertationsarbeit fanden rasante Fortschritte auf dem Gebiet der genetischen Schizophrenieforschung statt. Dies beruht vor allen Dingen auf der Entwicklung immer neuerer technischer Methoden, die dann im Verlauf für immer größere Studienpopulationen zur Verfügung stehen und im Verlauf auch immer kostengünstiger werden. Diese neuen Methoden haben die im Einleitungsteil beschriebenen Methoden schizophrener genetischer Forschungen mittlerweile großteils abgelöst, wobei Kandidatengenstudien noch immer von großer Wichtigkeit und Bedeutung sind, wenn es darum geht, bestimmte pathophysiologische Hypothesen der Schizophrenie zu testen sowie die pathogenetische Relevanz von

5. Diskussion

Veränderungen zu prüfen. Auch Karyotypisierungen behalten weiterhin ihre Bedeutung (siehe hierzu auch Kapitel 5.3.2.6.).

Genomweite Assoziationsstudien (GWAS):

Genomweite Assoziationsstudien, GWAS genannt, analysieren die genetische Prädisposition für eine Erkrankung, indem sie eine große Zahl genetischer Varianten, welche weitgehend das gesamte menschliche Genom abdecken, untersuchen (Verczkei/Mirnic, 2011). Solche Studien werden mit Patientenkollektiven untersucht, deren Größe die hier bisher beschriebenen zumeist um das 3 – 10-fache übersteigen.

GWAS untersuchen die Häufigkeiten von SNPs (= single nucleotide polymorphisms) in den meisten Genen und auch in nicht-kodierenden DNA-Bereichen (Gejman et al., 2010) von verschiedenen Individuen mit versus ohne eine bestimmte Erkrankung, um zu sehen und zu beurteilen, wie sehr sich die Häufigkeiten der verschiedenen Polymorphismen zwischen den betroffenen und den gesunden Individuen unterscheiden (Hosák et al., 2012). Dies geschieht unter Zuhilfenahme von sogenannten „SNP-Arrays“ (Duan et al., 2010), eine Art Schablone für eine große Anzahl häufiger SNPs (Gejman et al., 2010). GWAS sind zur Durchführung nicht auf pathophysiologische Hypothesen angewiesen (Gejman et al., 2010), wie dies für die Kandidatengenstudien der Fall ist. Vielmehr stellen sie einen Hypothese-freien Ansatz dar. Seltene Genvariationen oder neu entstandene Mutationen können sie allerdings nicht erfassen.

GWAS wurden für viele nicht-psychiatrische Krankheitsbilder mit sehr großem Erfolg eingesetzt. Was die Schizophrenie betrifft, so waren die Ergebnisse von GWAS weniger durchschlagend als anfangs erwartet, und erst das Zusammenführen verschiedener GWAS-Studien und –Resultate zu Metaanalysen führte zu genomweiten signifikanten Ergebnissen (Duan et al., 2010; Gejman et al., 2010; Rodriguez-Murillo et al., 2012). Leider kann im Rahmen dieser Dissertation nicht auf die einzelnen GWAS-Ergebnisse eingegangen werden. Kurz gesagt werden soll, dass viele der gefundenen SNPs in intergenischen/intronischen Bereichen lokalisiert sind (sie sind deshalb vermutlich nicht die direkt für die Schizophrenie kausalen SNPs) (Gejman et al., 2011; Rodriguez-Murillo et al., 2012). Viele dieser gefundenen SNPs vermitteln nur eine geringe Risikoerhöhung für die Schizophrenieentstehung (z.B. Tiwari et al., 2010; Duan et al., 2010). Es war kein Gen betroffen, das zuvor in Kandidatengenstudien als potenzielles Suszeptibilitäts-gen aufgefallen war (Gejman et al., 2010; Kim et al., 2011). Alle bisher entdeckten SNPs zusammengenommen könnten nicht die Mehrheit der genetischen Heritabilität bei Schizophrenie erklären (Rodriguez-Murillo et al., 2012; Verczkei/Mirnic, 2011).

Copy number variation (CNV)-Studien:

Neben SNPs kommen im Genom auch die sogenannten CNVs vor, bei denen es sich um submikroskopische Deletionen oder Duplikationen einer Größe von ca. 1 Kb bis mehreren Mb handelt (Verczkei/Mirnic, 2011). Diese stellen eine wichtige Quelle individueller genetischer Varianz dar (Doherty et al., 2012) und können entweder in der Bevölkerung häufige Polymorphismen oder de novo-Ereignisse sein. Auch bei der Mikrodeletion 22q11.2 handelt es sich um eine CNV, und zwar um die einzige, die bisher in einer einzelnen GWA-Studie eine genomweite Signifikanz erzielen konnte (ISC, 2008). Auch andere Plattformen als die GWAS kommen für CNV-Studien infrage wie z.B. die sogenannten Array-CGHs.

Eine Reihe von Studien haben herausgefunden, dass schizophrene Patienten mehr große (> 100 Kb) und seltene (< 1%) CNVs aufweisen als gesunde Probanden (Walsh et al., 2008; ISC, 2008; Xu et al., 2008; Kirov et al., 2009), und Schizophreniepatienten mit einem Erkrankungsbeginn im Kindesalter scheinen eine höhere CNV-Last aufzuweisen als adult-erkrankte schizophrene Patienten (Tam et al., 2009; Walsh et al., 2008). Bei der Mehrzahl der veröffentlichten Schizophrenie-CNV-Studien

5. Diskussion

zeigen sich wenig Überlappungen zwischen den Ergebnissen. Es gibt einzelne replizierte Loci, die v.a. chromosomale Regionen mit Genen betreffen, die an der synaptischen Entwicklung und Funktion beteiligt sind (Tam et al., 2009). Gefundene CNVs sind zumeist unspezifisch, man spricht von einer sogenannten Pleiotropie, d.h. sie können neben der Schizophrenie auch für andere Krankheiten verantwortlich sein bzw. dort gefunden werden (z.B. Gejman et al., 2010). Die CNVs unterstützen daher die Hypothese einer gemeinsamen genetischen Grundlage derjenigen Krankheiten, die mit einer neuronalen Entwicklungsstörung einhergehen (neben der Schizophrenie z.B. auch Bipolare Störungen oder das Aufmerksamkeitsdefizit- und Hyperaktivitätssyndrom).

Im Unterschied zu den SNPs, die häufig sind, jedoch nur eine niedrige Odds Ratio aufweisen, sind die CNVs selten, sie sind jedoch mit einem größeren Schizophrenieentstehungsrisiko verbunden. Dennoch konnte auch in CNV-Studien bisher nicht der Hauptfaktor der genetischen Schizophrenie-Heritabilität gefunden werden (falls ein solcher überhaupt existiert). Noch dazu kann bei den CNVs meist nicht gesagt werden, welches Gen/welche Gene des Deletions-/Duplikationsbereiches zur Entstehung der Schizophrenie beigetragen haben (Doherty et al., 2012) (siehe auch Kapitel 1.7.3.3.). Die Ergänzung um Ergebnisse aus z.B. Kandidatengenstudien ist sinnvoll und kann hier weiterhelfen.

Genexpressionsanalysen:

„Einen zusätzlichen Ansatz, um pathophysiologisch beteiligte Gene zu identifizieren, stellen Genexpressionsanalysen dar. Durch Microarray bzw. GeneChip-Techniken ist es möglich, bis zu 12.000 Gene gleichzeitig in einer Gewebe- bzw. Blutprobe hinsichtlich ihres mRNA-Expressionsniveaus zu messen. Über das Ausmaß der Expression kann auf die Aktivität der jeweiligen Gene rückgeschlossen werden.“ (Mehler-Wex/Renner, 2008) Diese Methodik ist zwar vielversprechend, wäre aber nur aussagekräftig, wenn frisches Gehirngewebe für die Expressionsanalyse zur Verfügung stünde. Post mortem-Gewebe oder gar Blut sind nur sehr eingeschränkt aussagefähig. Deshalb ist diese Methodik am ehesten für Tiermodelle geeignet (z.B. Genius, 2012).

Sequenzierungsstudien:

Mithilfe von Sequenzierungsstudien können verdächtige Gene z.B. aus GWAS oder CNV-Studien oder kann sogar das gesamte Genom von Schizophreniepatienten/Kontrollen sequenziert werden. So können nahezu alle SNPs und CNVs sowie auch epigenetische Veränderungen (DNA-Methylierung) aufgedeckt werden (Tiwari et al., 2010). Stichpunkte in diesem Zusammenhang sind die „Next-Generation Sequencing-“ und „Next-Next-Generation Sequencing-“Methoden, die innovative Verfahren der Hochdurchsatz-Sequenzierung darstellen (<http://www.bioscientia.de>) bzw. z.T. schon ohne vorherige PCR-Amplifizierung auskommen (Hendrich, 2011). (Siehe auch 5.5.4.). Hierbei muss man allerdings bedenken, dass jeder Mensch viele Hundert potenziell pathogene Varianten trägt. Eine Zuordnung zur Schizophrenie würde nur gelingen, wenn bestimmte Varianten häufiger bei Patienten als bei Kontrollen auftraten.

5.6.2. Ausblick auf zukünftige Forschungen

Trotz intensiver Forschung auf dem Gebiet der Genetik der Schizophrenie, ist es bisher (noch) nicht gelungen, einen genetischen Faktor zu finden, der alle oder die meisten Fälle von Schizophrenie erklären könnte (z.B. Girard et al., 2011; Vereczkei/Mirnic, 2011), d.h. der bei allen/den meisten Schizophreniepatienten zu finden ist. Vereczkei und Mirnic, 2011 sind der Meinung, dass es wahrscheinlich gar keinen Hauptfaktor genetischer Heritabilität bei der Schizophrenie gibt, dass auch die neuesten Forschungsansätze einen solchen Hauptfaktor nicht finden werden, und dass auch eine

5. Diskussion

Vergrößerung der Probandenzahlen auf Hunderttausende diesbezüglich nichts ändern wird. Das Problem sei die Komplexität der Biologie der Schizophrenie und nicht der Mangel an technisch gut funktionierenden Methoden (Vereczkei/Mirnic, 2011). Dies würde bedeuten, dass bisherige Strategien angepasst werden müssen, da nicht nach einem Hauptgen, sondern nach vielen schwach wirkenden genetischen Veränderungen gesucht werden muss.

Die Anzahl von Kandidatengenen für Schizophrenie wird auf über 1000 geschätzt (Girard et al., 2011). Darunter die tatsächlich relevanten zu identifizieren gelingt nur mit einem multidisziplinären Ansatz, und es müssen nun die Ergebnisse der verschiedenen Forschungsbereiche wie z.B. der Genetik, Epigenetik, Transkriptomik, Proteomik und Metabolomik zusammengeführt werden (Hosák et al., 2012; Lee et al., 2012).

6. Zusammenfassung

6. Zusammenfassung

Die juvenile Form der Schizophrenie ist definiert durch ein Erkrankungsalter von < 18 Jahren und ist mit einer besonders schlechten Krankheitsprognose verbunden.

Bei ungewöhnlich früh auftretenden Erkrankungen finden sich erfahrungsgemäß häufiger chromosomale und genetische Auffälligkeiten als bei im typischen, adulten Alter erkrankten Patienten. Diese jungen Patienten bieten so die Chance, eher hinter die (molekular-)genetischen Krankheitsmechanismen zu kommen. Eine Untersuchungsmöglichkeit diesbezüglich stellen Assoziations-/Kandidatengenstudien dar, durch die auch die pathogenetische Relevanz einer Veränderung abgeschätzt werden kann.

In der hier vorliegenden Dissertationsarbeit wurde neben einer allgemeinen Erfassung von strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen auch gezielt die Prävalenz/pathogenetische Relevanz der Mikrodeletion 22q11.2 sowie der *CHRNA4*-776ins3-Mutation in zwei Kohorten juveniler Schizophreniepatienten untersucht.

Die Mikrodeletion 22q11.2 geht mit einem erhöhten Risiko für eine Reihe physischer Auffälligkeiten einher. Außerdem ist sie mit einem ca. 30%-igen Schizophrenierisiko assoziiert, was nach dem Umstand, ein einziges Geschwister eines Schizophreniepatienten oder das Kind zweier Schizophrenie-erkrankter Eltern zu sein, als das drittgrößte bekannte Krankheitsrisiko gilt. Eingeschätzt werden sollte in dieser Arbeit die Bedeutung, d.h. die Prävalenz der Mikrodeletion 22q11.2 bei juvenil an Schizophrenie erkrankten Patienten, und es sollte untersucht werden, ob die Prävalenz dieser Mikrodeletion bei juvenilen Patienten größer ist als bei adulten Patienten, für die es bereits eine Reihe von Prävalenzstudien gibt. Die Mikrodeletion 22q11.2-Analyse erfolgte mithilfe der Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH) mittels der FISH-Sondenprobe TUPLE 1.

Bei *CHRNA4*-776ins3 handelt es sich um eine Mutation (Insertion dreier zusätzlicher DNA-Basen bzw. Insertion einer zusätzlichen Aminosäure im entsprechenden Protein), die im Zusammenhang mit der Autosomal-dominanten nächtlichen Frontallappenepilepsie = abgekürzt ADNFLE bei einer norwegischen Familie beschrieben wurde. Die Mitglieder der ADNFLE-Familie mit dieser Mutation weisen auffallend viele Schizophrenie-ähnliche Symptome auf. Es sollte deshalb untersucht werden, ob die 776ins3-Mutation, die den neuronalen nikotinischen Azetylcholinrezeptor betrifft, im Kontext der Schizophrenie eine größere Relevanz hat. Die *CHRNA4*-776ins3-Prävalenzanalyse erfolgte mithilfe eines Restriktionsenzymverdau (Restriktionsenzym *BclI*) und unter Zuhilfenahme der Referenzprobe eines bekannten 776ins3-Mutationsträgers aus obiger Familie.

Untersucht wurden insgesamt 109 juvenil-erkrankte psychotische Patienten, die aus zwei unterschiedlichen Quellen stammten, und zwar erstens aus einer großen Schizophreniestudie der Psychiatrischen Klinik der LMU und zweitens aus kinder- und jugendpsychiatrischen Kliniken in Regensburg, Passau, Landshut und München. Die Einschlusskriterien dieser beiden „Teilstudien“ waren unterschiedlich. In die zweite Gruppe miteingeschlossen wurden neben schizophrenen Patienten auch psychotische Patienten mit einer affektiven (v.a. bipolaren) oder einer schizoaffektiven Störung. In der Literatur häufen sich die Hinweise für eine möglicherweise gemeinsame genetische Basis psychotischer Krankheitsbilder.

In der konventionellen Chromosomenanalyse fand sich neben Kulturartefakten und numerischen/strukturellen Chromosomenaberrationen in einzelnen Zellen bei einem Patienten eine perizentrische Inversion von Chromosom 1 mit den Bruchstellen p31 und q25. Im Bereich der Bruchstellen liegen die drei Kandidatengene *PDE4B*, *ASTN1* und *GLUL*, die für die Krankheitsent-

6. Zusammenfassung

stehung beim betreffenden Patienten (mit-)verantwortlich sein könnten. Auch regulatorische Mechanismen der Genexpression könnten durch die große Inversion gestört sein und Gene betreffen, die im invertierten Bereich selbst oder auch außerhalb des invertierten Bereichs von Chromosom 1 gelegen sind. Zwei Patienten zeigten perizentrische heterochromatische Inversionen von Chromosom 9, während bei zwei weiteren Probanden gonosomale Auffälligkeiten nachweisbar waren (vergrößerter Heterochromatinbereich Yqh+ bzw. nicht näher eingrenzbare Auffälligkeit des Chromosoms Y). Heterochromatische und gonosomale Veränderungen sind in dieser oder ähnlicher Form bereits in der Literatur beschrieben worden. Die hier erhobenen Befunde unterstützen somit eine potenzielle Rolle dieser Veränderungen bei der Pathogenese der Schizophrenie.

Bei keinem der Patienten konnte eine Mikrodeletion 22q11.2 gefunden werden. Die Studie hier lässt sich am ehesten mit einer Prävalenzstudie von Ivanov et al. von 2003 vergleichen, in der unter 192 juvenilen psychotischen Patienten ebenfalls kein Mikrodeletion 22q11.2-Träger gefunden werden konnte. Das Ergebnis spricht gegen ein häufigeres Vorkommen der 22q11-Mikrodeletion bei juvenilen im Vergleich zu adulten psychotischen Patienten. Die Mikrodeletion 22q11.2 ist offenbar kein wesentlicher Risikofaktor für eine Juvenile Schizophrenie. Die hohen Prävalenzraten, die in drei anderen Studien gefunden worden sind (Usiskin et al., 1999; Sporn et al., 2004; Yan et al., 1998), sind möglicherweise durch eine unterschiedliche Definition des Erkrankungsalters und durch die Einbeziehung von ausschließlich sehr jung-erkrankten (Childhood-onset schizophrenia-)Patienten in diesen Studien zu erklären.

Auch die *CHRNA4*-776ins3-Mutation ließ sich bei keinem der getesteten Probanden nachweisen. Dennoch gibt es in der Literatur viele Hinweise auf eine Assoziation zwischen Epilepsie/ADNFLE und Schizophrenie einerseits und Schizophrenie und nikotinischem System andererseits. Eine Abwandlung der Untersuchungskriterien dahingehend, dass z.B. v.a. schizophrene Patienten mit bestimmten Charakteristika der SLPE (Schizophrenia-like Psychosis of Epilepsy) auf die *CHRNA4*-776ins3-Mutation hin untersucht würden, oder dass die Untersuchung auch auf die anderen, bekannten ADNFLE-nAChR-Mutationen ausgeweitet würde, wären daher für zukünftige Studien erfolgversprechend.

Es gibt inzwischen neue Methoden genetischer Schizophrenieforschung, unter ihnen die sogenannten GWAS und CNV-Studien. Beide konnten es bisher ebenfalls nicht schaffen, einen Hauptfaktor für die genetische Heritabilität der Schizophrenie zu identifizieren. Es wird deshalb zunehmend zweifelhafter, dass ein solcher Hauptfaktor überhaupt existiert. Vermutlich trägt jeder Patient eine individuelle Kombination seltener, teilweise neu entstandener genetischer Risikoallele. Da die funktionelle Auswirkung jedes einzelnen Allels gering sein dürfte, wird ihre Identifizierung nur in einem multidisziplinären Ansatz gelingen.

7. Anhang

7. Anhang

22q11.2 deletion		Sample screened for 22q11.2 deletions						Molecular		
%	N	Sample size	Mean age, y (range)	Male	MR	Population	Ascertainment issues	Screening	FISH confirmation	Reference
Clinically screened and special population samples										
33.3	3	15	30 (16–67)	47%	47%	Israeli, SZ	Hospitalized record linkage ($n = 7$) or referred with suggestive 22qDS features ($n = 8$)	FISH	Yes	Gothelf et al. [42]
33.3	2	6	24 (18–54)	67%	17%	South African white, SZ	Patients ($n = 6$) with ≥ 2 22qDS features, of 85 patients assessed	FISH	Yes	Wiehahn et al. [43]
16.7	1	6	NI	NI	NI	Japanese (Okinawa), SZ	$n = 6$ selected by a geneticist, of 12 patients with facial features identified by psychiatrists (of 268 inpatients)	FISH	Yes	Sugama et al. [44]
7.1	2	28	NI	NI	All	Welsh, dual diagnosis, inpatient MR hospital	MR and psychotic illness	FISH	Yes	Murphy et al. [45]
5.3	4	75	NI	63%	Excluded	US, childhood-onset SZ (onset < 13 y)	No somatic illness	FISH	Yes	Sporn et al. [10]
More general samples										
2.4	2	85	31.8 (17–48)	61%	NI	South African white, SZ	Recontact of participants in a genetic study	SNP markers	Yes	Wiehahn et al. [43]
2	2	100	NI	78%	NI	US (Baltimore), mostly SZ	Recontact of participants in an epidemiologic study	FISH	Yes	Karayiorgou et al. [46]
1.1	3	265	NI	NI	NI	Polish, psychosis	NI	FISH	Yes	Pawlowska et al. [47]
0.9	6	634	45.8 (18–83)	63%	NI	Ashkenazi Jewish (Israel), SZ	Hospitalized patients, genetic association study	7 ms, 3 SNP markers from 600-kb <i>COMT</i> region	No	Horowitz et al. [48]
0.3	1	300	44.3 (19–78)	56%	NI	Japanese, SZ	Hospitals within 200 km of Tokyo	3 ms, 1 SNP (<i>COMT</i>) markers	Yes	Arinami et al. [49]
0.2	1	470	NI	69%	Excluded	British (86 of 415 onset age < 18 y), SZ; Bulgarian (55 onset age < 18 y), SZ	Genetic association study	3–5–ms markers	No	Ivanov et al. [50]
0	0	177	47	54%	NI	Han Chinese (Taiwan), SZ	Private psychiatric hospital	4 <i>COMT</i> SNPs; 5 ms markers for 28 homozygous patients	NA	Chen et al. [51]

7. Anhang

22q11.2 deletion		Sample screened for 22q11.2 deletions						Molecular		
%	N	Sample size	Mean age, y (range)	Male	MR	Population	Ascertainment issues	Screening	FISH confirmation	Reference
0	0	311	41	74%	NI	Dutch, SZ	146 (47%) patients with a deficit (negative) syndrome subtype	MLPA (DiGeorge kit)	NA	Hoogendoorn et al. [52]

22qDS—22q11.2 deletion syndrome; FISH—fluorescence in situ hybridization; MLPA—multiplex ligation-dependent probe amplification; MR—mental retardation; ms—microsatellite; NA—not applicable; NI—no information; SNP—single nucleotide polymorphism; SZ—schizophrenia.

Abb. 51 Prävalenz der 22q11.2-Deletion bei Schizophrenie (SZ)-Patienten (aus Bassett/Chow, 2008)

7. Anhang

Gene	Mutation	Ethnic origin	Number of clinically affected individuals (f/m)	Neurological/psychiatric features other than NFLE (n/t)	Antiepileptic drug treatment (n)/seizure severity (n)/drug efficiency (n)	References
CHRNA4	S248F (S280F)	British-Australian	27 (18/9)		CBZ average 690 mg (NA), MD (11)/controlled in most patients (NA)	1,16–18
		Spanish	11 (7/4)		CBZ 600–1000 mg (4), VPA 700 mg (1), NT (2), NA (4)/controlled (6), poorly controlled (2)	
		Norwegian	22 (10/12)	Mild mental retardation (1/22) Psychiatric disorder, unclassified (1/22) Psychological problems (NA)	NA/controlled (10), uncontrolled (1), SRI (6), NA (5)	
	S252L (S284L)	Scottish	7 (4/3)		NA (1), NT (6)/SRI (6), severe (1)	6–8,23,25
		Japanese	5 (2/3)	Mild mental retardation (3/5) Early childhood onset of epilepsy (3/5)	CBZ NA (1), MD (2), NT (1), NA (1)/controlled (1), SRI (1), poorly controlled (2), NA (1)	
		Lebanese	2 (1/1)	Low average intellect (1/2) Early childhood onset of epilepsy (2/2)	NA/poorly controlled (1), NA (1)	
		Korean	9 (7/2)	Mild to moderate mental retardation (7 out of 9 available for testing)	CBZ (1), MD (5), NT (1), NA (2)/SRI (1), improvement (3), poorly controlled (3)	
	776ins3 (865-873insGCT)	Polish	3 (1/2)	Early childhood onset of epilepsy (2/3) Schizophrenia (1/11) Negative symptoms of schizophrenia (1/11) Recurrent psychosis (1/11) Psychiatric disorder, unspecified (3/11) (5 family members were not available for testing)	MD (2), NT (1)/poorly controlled (3) NA	5,9
		Norwegian	11 (5/6)			
	T265I (T293I)	German	2 (0/2)		CBZ 2400 mg (1), CBZ NA (1)/improvement (1), poorly controlled (1) MD (1)/poorly controlled (1)	19
CHRN2	R308H (R336H)	Chinese	1 (0/1)	NA		13
	V287L	Italian	8 (2/6)		CBZ 400–800 mg (6), NT (2)/controlled (6), SRI (1), mild (1)	2,22
	V287M	Scottish	10 (6/4)	Psychological problems mentioned, numbers not specified	CBZ NA (4), MD (3), NT (3)/SRI (NA), poorly controlled (1)	18,20,21
		Spanish	6 (3/3)		CBZ NA (2), PB 150 mg (1), NT (3), NA (1)/SRI (1), improved (1), controlled (2), poorly controlled (1), NA (1)	
	L301V	Turkish Cypriot	3 (2/1)		CBZ NA (1), NT (2)/SRI (1), mild (1) poorly controlled (1)	15
	V308A	Scottish	5 (4/1)		LTG NA (1)/controlled (1)	15
		German	4 (2/2)		CBZ NA (2)/controlled (2)	
	I312M	English	2 (2/0)	Low average intellect with significant memory deficits (verbal) (2/2) Psychiatric episode with delusional ideas (1/2) Normal intelligence with moderate memory deficits (verbal) (1/2) Normal intelligence with significant memory deficits (verbal/visual) (1/2)	MD (2)/controlled (2)	10,24
		Korean	2 (2/0)		NA	
CHRNA2	I279N	Italian	10 (8/2)	NA	NA/controlled (2), poorly controlled (8)	14

ADNFLE mutations frequently associated with additional major neurological or psychiatric symptoms are given in bold. Mutations are named as in the original references, for *CHRNA4* numberings according to reference sequences (NP_000735.1, NP_000739.1) are given in brackets; NA, data not available; NT, not currently treated; n, number of patients; f/m, female/male; n/t, number of total; MD, patients with more than one drug; SRI, spontaneous remission or improvement. Antiepileptic drugs (number of patients given in brackets): CBZ, carbamazepin; PB, phenobarbital; PHT, phenytoin; LTG, lamotrigine.

Abb. 52 Die bekannten ADNFLE-Familien mit klinischen, insbesondere neurologisch-psychiatrischen Merkmalen (aus Steinlein et al., 2012)

7. Anhang

Kooperationsprojekt: „Zytogenetische und Kandidatengen-Analysen bei kindlichen und jugendlichen Psychosen“

Erhebungsbogen:

Einsendende Klinik:

AnsprechpartnerIn:

Tel.-Nr.:

Angaben zur Patientin / zum Patienten (Bitte zutreffende Antwortmöglichkeit einkreisen):

Name:

Vorname:

Anschrift:

Geburtsdatum:

Geschlecht: weiblich / männlich

Hauptdiagnose (ICD-10-Nr.):

Grad der Sicherheit: - ganz sicher
- ziemlich sicher
- unsicher

Ggf. Differenzialdiagnose(n) (ICD-10-Nr.):

Ggf. weitere psychiatrische Diagnosen (ICD-10-Nr.):

Alter bei Ersterkrankung [in Jahren]:

Grad der Sicherheit: - ganz sicher
- ziemlich sicher
- unsicher

Wie wurde das Ersterkrankungsalter festgelegt?

- Untersuchung bei Ersterkrankung durch: Kinder- und Jugendpsychiater / Psychiater
- Retrospektiv (Anamnese)

Bisheriger Krankheitsverlauf:

- einmalige psychotische Dekompensation mit vollständiger Remission
- einmalige psychotische Dekompensation mit unvollständiger Remission
- mehrmalige psychotische Dekompensation mit vollständiger Remission
- mehrmalige psychotische Dekompensation mit unvollständiger Remission

Prämorbidetes Intelligenzniveau:

Unbekannt / überdurchschnittlich / durchschnittlich / unterdurchschnittlich / geistige Behinderung

Einschätzung auf welcher Grundlage? IQ-Test / geschätzt (Zeugnisse, Anamnese)

Letzter Schulbesuch: Nicht bekannt, Hauptschule, Realschule, Gymnasium, Schule zur Individuellen Lernhilfe (L-Schule), Geistigbehinderten-Schule, Körperbehinderten-Schule, Schule zur Erziehungshilfe (E-Schule), Montessori-Schule, sonstige:

Abschluss: Keiner, Förderschule, Hauptschule, Realschule, Gymnasium, Studium

7. Anhang

Kooperationsprojekt: „Zytogenetische und Kandidatengen-Analysen bei kindlichen und jugendlichen Psychosen“

Berufliche Ausbildung: Nein / Ja. Wenn Ja, welche?

Körperliche Merkmale:

Länge: cm; Gewicht: kg; Kopfumfang: cm;

Angeborener Herzfehler: Nein / Ja. Wenn ja, welcher?

Angeborene Gaumen- / Lippen-Kiefer-Gaumenspalte: Ja / Nein / unbekannt;

Näseln von Kindheit an: Ja / Nein / unbekannt;

Lange Hände und Finger: Ja / Nein;

Bekannte Hypokalzämie und/oder Hypoparathyroidismus: Ja / Nein / unbekannt;

Bekannte Thymushypoplasie oder schwerer Immundefekt in der Kindheit: Ja /
Nein / unbekannt;

Epilepsie: Ja / Nein;

Sonstige eindeutige angeborene Auffälligkeiten (z.B. Klumpfuß, Hypospadie,
Nierenanomalien, Kyphoskoliose, etc.): Ja / Nein / unbekannt; Wenn ja, welche?

Sprachentwicklungsverzögerung / Sprachtherapie? Ja / Nein / unbekannt

Familienanamnese:

Familiäre Belastung (Verwandte 1. Grades) für:

- Psychotische Störungen? Wenn ja, welche und bei wem?

- Sonstige psychiatrische Störungen? Wenn ja, welche und bei wem?

Vielen Dank für Ihre Mitarbeit!!!

Abb. 53 Erhebungsbogen für die BZK Landshut, Passau, Regensburg und dem Heckscher-Klinikum München

8. Literaturverzeichnis

8. Literaturverzeichnis

- Adachi N, Onuma T, Nishiwaki S, Murauchi S, Akanuma N, Ishida S, Takei N. Inter-ictal and post-ictal psychoses in frontal lobe epilepsy: a retrospective comparison with psychoses in temporal lobe epilepsy. *Seizure* (2000) 9: 328-335
- Adler LE, Olincy A, Waldo M, Harris JG, Griffith J, Stevens K, Flach K, Nagamoto H, Bickford P, Leonard S, Freedman R. Schizophrenia, sensory gating, and nicotinic receptors. *Schizophr Bull* (1998) 24: 189-202
- Akbas E, Senli H, Hallioglu O, Batmaz S, Erdogan NE. Association of Pericentric Inversion of Chromosome 9 (inv[9][p11q13]) and Genetic Diseases: Case Report. *Labmedicine* (2010) 41(2): 96-98
- Alaghband-Rad J, McKenna K, Gordon CT, Albus KE, Hamburger SD, Rumsey JM, Frazier JA, Lenane MC, Rapoport JL. Childhood-onset schizophrenia: The severity of premorbid course. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* (1995) 34: 1273-1283
- Allen NC, Bagade S, McQueen MB, Ioannidis JP, Kavvoura FK, Khoury MJ, Tanzi RE, Bertram L. Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: The SzGene database. *Nat Genet* (2008) 40(7): 827-834
- Andermann F, Kobayashi E, Andermann E. Genetic Focal Epilepsies: State of the Art and Paths to the Future. *Epilepsia* (2005) 46(Suppl. 10): 61-67
- Andreasen NC. Schizophrenia: the fundamental questions. *Brain Res Rev* (2000) 31: 106-112
- Antshel KM, AbdulSabur N, Roizen N, Fremont W, Kates WR. Sex differences in cognitive functioning in velocardiofacial syndrome (VCFS). *Dev Neuropsychol* (2005) 28: 849-869
- Antshel KM, Fremont W, Kates WR. The neurocognitive phenotype in velo-cardio-facial syndrome: a developmental perspective. *Dev Disabil Res Rev* (2008) 14: 43-51
- Aridon P, Marini C, Di Resta C, Brilli E, De Fusco M, Politi F, Parrini E, Manfredi I, Pisano T, Pruna D, Curia D, Cianchetti C, Pasqualetti M, Becchetti A, Guerrini R, et al.. Increased sensitivity of the neuronal nicotinic receptor alpha 2 subunit causes familial epilepsy with nocturnal wandering and ictal fear. *Am J Hum Genet* (2006) 79(2): 342-50
- Arinami T. Analyses of the associations between the genes of 22q11 deletion syndrome and schizophrenia. *J Hum Genet* (2006) 51: 1037-1045
- Arinami T, Ohtsuki T, Takase K, Shimizu H, Yoshikawa T, Horigome H, Nakayama J, Toru M. Screening for 22q11 deletions in a schizophrenia population. *Schizophr Res* (2001) 52: 167-170
- Asarnow JR, Tompson MC, Goldstein MJ. Psychosocial factors: The social context of child and adolescent-onset schizophrenia. In: Remschmidt H (editor): *Schizophrenia in Children and Adolescents*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K. (2001)
- Asarnow JR, Tompson MC, McGrath EP. Annotation: Childhood-onset schizophrenia: Clinical and treatment issues. *J Child Psychol Psychiatry* (2004) 45: 180-194
- Athanasias L, Mattingsdal M, Kahler AK, Brown A, Gustafsson O, Agartz I, Giegling I, Muglia P, Cichon S, Rietschel M, Pietiläinen OP, Peltonen L, Bramon E, Collier D, Clair DS, et al..

8. Literaturverzeichnis

- Gene variants associated with schizophrenia in a Norwegian genome-wide study are replicated in a large European cohort. *J Psychiatr Res* (2010) 44(12): 748-753
- Axelsson R, Wahlström J. Chromosome aberrations in patients with paranoid psychosis. *Hereditas* (1984) 100: 29-31
- Baker KD, Skuse DH. Adolescents and young adults with 22q11 deletion syndrome: psychopathology in an at-risk group. *Br J Psychiatry* (2005) 186: 115-120
- Baker K, Vorstman JA. Is there a core neuropsychiatric phenotype in 22q11.2 deletion syndrome? *Curr Opin Neurol* (2012) 25(2): 131-7
- Barrantes FJ, Aztiria E, Rauschemberger MB, Vasconsuelo A. The Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor in Some Hereditary Epilepsies. *Neurochem Res* (2000) 25(5): 583-590
- Bassett AS, Chow EWC. 22q11 Deletion Syndrome: A Genetic Subtype of Schizophrenia. *Biol Psychiatry* (1999) 46(7): 882-891
- Bassett AS, Chow EWC, AbdelMalik P, Gheorghiu M, Husted J, Weksberg R. The schizophrenia phenotype in 22q11 deletion syndrome. *Am J Psychiatry* (2003) 160: 1580-1586
- Bassett AS, Chow EWC. Schizophrenia and 22q11.2 Deletion Syndrome. *Curr Psychiatry Rep* (2008) 10(2) 148-157
- Baxter DF, Kirk M, Garcia AF, Raimondi A, Holmqvist MH, Flint KK, Bojanic D, Distefano PS, Curtis R, Xie Y. A novel membrane potential-sensitive fluorescent dye improves cell-based assays for ion channels. *J Biomol Screen* (2002) 7: 79-85
- Ben-David E, Shiffman S, International Schizophrenia Consortium. Further investigation of the association between rs7341475 and rs17746501 and schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* (2010) 153B: 1244-1247
- Bianchi M, Emanuele E, Davin A, Gagliardi S, Cova E, Meli V, Trotti R, Cereda C. Comparison of three methods for genotyping of prothrombotic polymorphisms. *Clin Exp Med* (2010) 10: 269-272
- Black DW, Andreasen NC. Schizophrenia, Schizophreniform, and Delusional (Paranoid) Disorders, pp 425-478. In: *The American Psychiatric Association Textbook of Psychiatry*. Washington (1999)
- Bonati MT, Combi R, Asselta R, Duga S, Malcovati M, Oldani A, Zucconi M, Ferini-Strambi L, Dalpra L, Tenchini ML. Exclusion of linkage of nine neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit genes expressed in brain in autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy in four unrelated families. *J Neurol* (2002) 249: 967-74
- Breese CR, Lee MJ, Adams CE, Sullivan B, Logel J, Gillen KM, Marks MJ, Collins AC, Leonard S. Abnormal regulation of high affinity nicotinic receptors in subjects with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* (2000) 23: 351-364
- Breitkopf O. Variationen im BDNF-Gen im Zusammenhang mit kognitiven Phänotypen. Medizinische Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (2008)
- Briegel W, Cohen M. Das 22q11.2-Deletionssyndrom und seine Relevanz für die Kinder- und Jugendpsychiatrie – Ein Überblick über Ätiologie, körperliche Symptomatik, Entwicklungsaspekte und psychiatrische Störungen. *Z Kinder Jugendpsychiatr Psychother* (2004) 32(2): 107-115

8. Literaturverzeichnis

- Bruens JH. Psychoses in epilepsy. *Psychiatr Neurol Neurochir* (1971) 74: 175-192
- Buckton KE, Spowart G, Newton MS, Evans HJ. Forty four probands with additional 'marker' chromosome. *Hum Genet* (1985) 69: 353-370
- Burgoyne PS. Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosomes of Mammals. *Hum Genet* (1982) 61: 85-90
- Cadenhead KS, Swerdlow NR, Shafer KM, Diaz M, Braff DL. Modulation of the startle response and startle laterality in relatives of schizophrenic patients and in subjects with schizotypal personality disorder: evidence of inhibitory deficits. *Am J Psychiatry* (2000) 157: 1660-1668
- Cairns NJ, Wonnacott S. [3H](-)nicotine binding sites in fetal human brain. *Brain Res* (1988) 475(1): 1-7
- Campbell LE, Daly E, Toal F, Stevens A, Azuma R, Catani M, Ng V, van Amelsvoort T, Chitnis X, Cutter W, Murphy DG, Murphy KC. Brain and behaviour in children with 22q11.2 deletion syndrome: a volumetric and voxel-based morphometry MRI study. *Brain* (2006) 129(Part 5): 1218-1228
- Cannon-Spoor HE, Potkin SG, Wyatt RY. Measurement of pre-morbid adjustment in chronic schizophrenia. *Schizophr Bull* (1982) 8: 470-484
- Carlson C, Sirotkin H, Pandita R, Goldberg R, McKie J, Wadey R, Patanjali SR, Weissman SM, Anyane-Yeboa K, Warburton D, Scambler P, Shprintzen R, Kucherlapati R, Morrow BE. Molecular definition of 22q11 deletions in 151 velo-cardio-facial syndrome patients. *Am J Hum Genet* (1997) 61(3): 620-629
- Cascella NG, Schretlen DJ, Sawa A. Schizophrenia and epilepsy: is there a shared susceptibility? *Neurosci Res* (2009) 63(4): 227-235
- Chambers RA, Krystal JH, Self DW. A neurobiological basis for substance abuse comorbidity in schizophrenia. *Biol Psychiatry* (2001) 50: 71-83
- Combi R, Dalprà L, Tenchini ML, Ferini-Strambi L. Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. A critical overview. *J Neurol* (2004) 251: 923-934
- Combi R, Dalprà L, Ferini-Strambi L, Tenchini ML. Frontal Lobe Epilepsy and Mutations of the Corticotropin-Releasing Hormone Gene. *Ann Neurol* (2005a) 58: 899-904
- Combi R, Ferini-Strambi L, Montrucoli A, Bianchi V, Malcovati M, Zucconi M, Dalprà L, Tenchini ML. Two new putative susceptibility loci for ADNFLE. *Brain Res Bull* (2005b) 67: 257-263
- Cooper E, Couturier S, Ballivet M. Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* (1991) 350: 235-8
- Corvin AP. Two patients walk into a clinic...a genomics perspective on the future of schizophrenia. *BMC Biol* (2011) 9: 77
- Court JA, Perry EK, Spurden D, Griffiths M, Kerwin JM, Morris CM, Johnson M, Oakley AE, Birdsall NJ, Clementi F, Perry RH. The role of the cholinergic system in the development of the human cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* (1995) 90(1/2): 159-67
- Court J, Spurden D, Lloyd S, McKeith I, Ballard C, Cairns N, Kerwin R, Perry R, Perry E. Neuronal nicotinic receptors in dementia with Lewy bodies and schizophrenia: α -bungarotoxin and nicotine binding in the thalamus. *J Neurochem* (1999) 73: 1590-1597

8. Literaturverzeichnis

- Czech DP, Lee J, Sim H, Parish CL, Vilain E, Harley VR. The human testis-determining factor SRY localizes in midbrain dopamine neurons and regulates multiple components of catecholamine synthesis and metabolism. *J Neurochem* (2012) 122: 260-271
- D'Souza M, Markou A. Schizophrenia and tobacco smoking comorbidity: nAChR agonists in the treatment of schizophrenia-associated cognitive deficits. *Neuropharmacology* (2012) 62: 1564-1573
- Davies K. Human genetics. The essence of inactivity. *Nature* (1991) 349: 15-16
- Davodyfar J. Das RGS4-Gen in der Schizophrenie. Medizinische Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (2006)
- De la Fuente-Cortés BE, Cerda-Flores RM, Dávila-Rodríguez MI, García-Vielma C, De la Rosa Alvarado RM, Cortés-Gutiérrez EI. Chromosomal abnormalities and polymorphic variants in couples with repeated miscarriage in Mexico. *Reprod Biomed Online* (2009) 18(4): 543-8
- de la Garza R, Bickford-Wimer PC, Hoffer BJ, Freedman R. Heterogeneity of nicotine actions in the rat cerebellum: an in vivo electrophysiologic study. *J Pharmacol Exp Ther* (1987) 240(2): 689-95
- De Leon J, Tracy J, McCann E, Mcgrory A, Diaz F. Schizophrenia and tobacco smoking: a replication study in another US psychiatric hospital. *Schizophr Res* (2002) 56: 55-65
- De Luca V, Wong AHC, Muller DJ, Wong GWH, Tyndale RF, Kennedy JL. Evidence of association between smoking and alpha 7 nicotinic receptor subunit gene in schizophrenia patients. *Neuropsychopharmacol* (2004) 29: 1522-1526
- De Luca V, Voineskos S, Wong G, Kennedy JL. Genetic interaction between $\alpha 4$ and $\beta 2$ subunits of high affinity nicotinic receptor: analysis in schizophrenia. *Exp Brain Res* (2006) 174: 292-296
- Debbane M, Glaser B, David MK, Feinstein C, Eliez S. Psychotic symptoms in children and adolescents with 22q11.2 deletion syndrome: neuropsychological and behavioral implications. *Schizophr Res* (2006) 84: 187-193
- Dechert U. Gelelektrophoresen, 37-46. In: Jansohn M, Rothhämel S (Hrsg.): *Gentechnische Methoden – Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 5. Aufl. Springer Spektrum (2012)
- DeLisi LE, Crow TJ. Evidence for a Sex Chromosome Locus for Schizophrenia. *Schizophr Bull* (1989) 15(3): 431-440
- Demirhan O, Taştan D. Chromosome aberrations in a schizophrenia population. *Schizophr Res* (2003) 65: 1-7
- di Corcia G, Blasetti A, De Simone M, Verrotti A, Chiarelli F. Recent advances on autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy: „understanding the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR)“. *Eur J Paediatr Neurol* (2005) 9: 59-66
- Didenko VV. DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications. *Biotechniques* (2001) 31: 1106-1121
- Doherty JL, O'Donovan MC, Owen MJ. Recent genomic advances in schizophrenia. *Clin Genet* (2012) 81: 103-109

8. Literaturverzeichnis

- Dome P, Lazary J, Kalapos MP, Rihmer Z. Smoking, nicotine and neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev* (2010) 34: 295-342
- Done DJ. Childhood antecedents of schizophrenia and affective illness: social adjustment at ages 7 and 11. *Br Med J* (1994) 309: 699-703
- Drew LJ, Crabtree GW, Markx S, Stark KL, Chaverneff F, Xu B, Mukai J, Fenelon K, Hsu PK, Gogos JA, Karayiorgou M. The 22q11.2 microdeletion: fifteen years of insights into the genetic and neural complexity of psychiatric disorders. *Int J Dev Neurosci* (2011) 29(3): 259-281
- Driscoll DA, Spinner NB, Budarf ML, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Goldberg RB, Shprintzen RJ, Saal HM, Zonana J, Jones MC. Deletions and microdeletions of 22q11.2 in velo-cardio-facial syndrome. *Am J Med Genet* (1992) 44: 261-268
- Duan J, Sanders AR, Gejman PV. Genome-Wide Approaches to Schizophrenia. *Brain Res Bull* (2010) 83(3-4): 93-102
- Durany N, Zochling R, Boissl KW, Paulus W, Ransmayr G, Tatschner T, Danielczyk W, Jellinger K, Deckert J, Riederer P. Human post-mortem striatal $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor density in schizophrenia and Parkinson's syndrome. *Neurosci Lett* (2000) 287: 109-112
- Eaton WW, Byrne M, Ewald H, Mors O, Chen CY, Agerbo E, Mortensen PB. Association of schizophrenia and autoimmune diseases: linkage of Danish National Registers. *Am J Psychiatry* (2006) 163: 521-8
- Edelmann L, Pandita RK, Morrow BE. Low-copy repeats mediate the common 3-Mb deletion in patients with velo-cardio-facial syndrome. *Am J Hum Genet* (1999a) 64: 1076-1086
- Edelmann L, Pandita RK, Spiteri E, Funke B, Goldberg R, Palanisamy N, Chaganti RS, Magenis E, Shprintzen RJ, Morrow BE. A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Hum Mol Genet* (1999b) 8: 1157-1167
- Eckstrand K, Addington AM, Stromberg T, Merriman B, Miller R, Gochman P, Long R, Dutra A, Chen Z, Meltzer P, Nelson SF, Rapoport JL. Sex chromosome anomalies in childhood onset schizophrenia: an update. *Mol Psychiatry* (2008) 13: 910-917
- Eggers C, Bunk D, Krause D. Schizophrenia with onset before the age of eleven. *J Aut Develop Disord* (2000) 30: 29-38
- Elgoyhen AB, Vetter DE, Katz E, Rothlin CV, Heinemann SF, Boulter J. Alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (2001) 98: 3501-3506
- Fabisch H, Kroisel PM, Fabisch K. Genetische Risikofaktoren für schizophrene Erkrankungen. *Fortschr Neurol Psychiat* (2005) 73: Sonderheft 1, 44-50
- Feinstein C, Eliez S, Blasey C, Reiss AL. Psychiatric disorders and behavioral problems in children with velocardiofacial syndrome: usefulness as phenotypic indicators of schizophrenia risk. *Biol Psychiatry* (2002) 51: 312-318
- Ferreira MA, O'Donovan MC, Meng YA, Jones IR, Ruderfer DM, Jones L, Fan J, Kirov G, Perlis RH, Green EK, Smoller JW, Grozeva D, Stone J, Nikolov I, Chambert K, et al.. Collaborative genome-wide association analysis supports a role for *ANKK3* and *CACNA1C* in bipolar disorder. *Nat Genet* (2008) 40(9): 1056-1058

8. Literaturverzeichnis

- Findling RL, Schulz SC, Reed AD, Blumer JL. The antipsychotics: a pediatric perspective. *Pediatr Clin North Am* (1998) 45: 1205-1232
- FitzGerald MG, MacDonald DJ, Krainer M, Hoover I, O'Neil E, Unsal H, Silva-Arrieto S, Finkelstein DM, Beer-Romero P, Englert C, Sgroi DC, Smith BL, Younger JW, Garber JE, Duda RB, et al.. Germ-line BRCA1 mutations in Jewish and non-Jewish women with early-onset breast cancer. *N Engl J Med* (1996) 334: 143-149
- Fiuza UM, Arias AM. Cell and molecular biology of Notch. *J Endocrinol* (2007) 194(3): 459-474
- Fleischhaker C, Schulz E, Tepper K, Martin M, Hennighausen K, Remschmidt H. Long-Term Course of Adolescent Schizophrenia. *Schizophr Bull* (2005) 31(3): 769-780
- Folsom TD, Fatemi SH. The involvement of Reelin in neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology* (2013) 68: 122-135
- Freedman R, Hall M, Adler LE, Leonard S. Evidence in postmortem brain tissue for decreased numbers of hippocampal nicotinic receptors in schizophrenia. *Biol Psychiatry* (1995) 38: 22-33
- Freedman R, Adams CE, Adler LE, Bickford PC, Gault J, Harris JG, Nagamoto HT, Olincy A, Ross RG, Stevens KE, Waldo M, Leonard S. Inhibitory neurophysiological deficit as a phenotype for genetic investigation of schizophrenia. *Am J Med Genet* (2000) 97: 58-64
- Galzi JL, Changeux JP. Neuronal nicotinic receptors: molecular organization and regulations. *Neuropharmacology* (1995) 34: 563-582
- Gardner RJM, Sutherland GR. Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. 3rd edition Oxford University Press (2004)
- Gejman PV, Sanders AR, Duan J. The Role of Genetics in the Etiology of Schizophrenia. *Psychiatr Clin North Am* (2010) 33(1): 35-66
- Gejman PV, Sanders AR, Kendler KS. Genetics of Schizophrenia: New Findings and Challenges. *Annu Rev Genomics Hum Genet* (2011) 12: 121-44
- Gella A, Segura M, Durany N, Pfuhlmann B, Stober G, Gawlik M. Is Ankyrin a genetic risk factor for psychiatric phenotypes? *BMC Psychiatry* (2011) 11: 103
- Genius J, Benninghoff J, Reuter N, Braun I, Giegling I, Hartmann A, Möller HJ, Rujescu D. Dysequilibrium of neuronal proliferation and apoptosis in a pharmacological animal model of psychosis. *Methods* (2012) 56(4): 519-27
- Gerngroß C. Gedächtnisleistungen in Assoziation mit Polymorphismen des 5-HT_{2A}-Rezeptorgens. Medizinische Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (2009)
- Getz K, Hermann B, Seidenberg M, Bell B, Dow C, Jones J, Woodard A, Rutecki P, Sheth R, O'Leary D, Magnotta V. Negative symptoms in temporal lobe epilepsy. *Am J Psychiatry* (2002) 159: 644-651
- Gibbs FA, Gibbs EL. Atlas of electroencephalography. Addison-Wesley Press, Cambridge, MA (1952)
- Gibson NJ. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clin Chim Acta* (2006) 363: 32-47
- Girard SL, Xiong L, Dion PA, Rouleau GA. Where are the missing pieces of the schizophrenia genetics puzzle? *Curr Opin Genet Dev* (2011) 21: 310-316

8. Literaturverzeichnis

- Gogtay N, Rapoport J. Clozapine use in children and adolescents. *Expert Opin Pharmacother* (2008) 9: 459-465
- Gonnermann C. Der Interleukin-1-Genkomplex in der Schizophrenie. Humanbiologische Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (2004)
- Gordon CT, Frazier JA, McKenna K, Giedd J, Zametkin A, Zahn T, Hommer D, Hong W, Kaysen D, Albus KE, Rapoport JL. Childhood-onset schizophrenia: An NIMH study in progress. *Schizophr Bull* (1994) 20: 697-712
- Gothelf D, Frisch A, Munitz H, Rockah R, Aviram A, Mozes T, Birger M, Weizman A, Frydman M. Velocardiofacial Manifestations and Microdeletions in Schizophrenic Inpatients. *Am J Med Genet* (1997) 72: 455-461
- Gothelf D, Feinstein C, Thompson T, Gu E, Penniman L, Van Stone E, Kwon H, Eliez S, Reiss AL. Risk factors for the emergence of psychotic disorders in adolescents with 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Psychiatry* (2007) 164: 663-669
- Gotti C, Fornasari D, Clementi F. Human neuronal nicotinic receptors. *Prog Neurobiol* (1997) 53(2): 199-237
- Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* (2004) 74(6): 363-96
- Green WH, Padron-Gayol M, Hardesty AS, Bassiri M. Schizophrenia with childhood onset: A phenomenological study of 38 cases. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* (1992) 31: 968-976
- Greenbaum L, Levin R, Lerer E, Alkelai A, Kohn Y, Heresco-Levy U, Ebstein RP, Lerer B. Association of reelin (RELN) single nucleotide polymorphism rs7341475 with prepulse inhibition in the Jewish Israeli population. *Biol Psychiatry* (2011) 69: e17-e18
- Guan ZZ, Zhang X, Blennow K, Nordberg A. Decreased protein level of nicotinic receptor $\alpha 7$ subunit in the frontal cortex from schizophrenic brain. *Neuroreport* (1999) 10: 1779-1782
- Gupta S, Rajaprabhakaran R, Arndt S, Flaum M, Andreasen NC. Premorbid adjustment as a predictor of phenomenological and neurobiological indices in schizophrenia. *Schizophr Res* (1995) 16: 189-197
- Häfner H. Die Rolle von Geschlecht und Gehirn bei Schizophrenie, pp 297-330. In: Lauterbacher S, Güntürkün O, Hausmann M (editors): *Gehirn und Geschlecht. Neurowissenschaft des kleinen Unterschieds zwischen Mann und Frau*. Springer, Heidelberg (2007)
- Häfner H, an der Heiden W. Epidemiology of schizophrenia. *Can J Psychiatry* (1997) 42: 139-151
- Hall H, Lawyer G, Sillén A, Jönsson EG, Agartz I, Terenius L, Arnborg S. Potential genetic variants in schizophrenia: a Bayesian analysis. *World J Biol Psychiatry* (2007) 8: 12-22
- Hay BN. Deletion 22q11: Spectrum of Associated Disorders. *Semin Pediatr Neurol* (2007) 14: 136-139
- Hendrich S. Molekulargenetische Analysen nikotinischer Acetylcholinrezeptoren und assoziierter Interaktionspartner bei Patienten mit Autosomal-dominanter nächtlicher Frontallappenepilepsie. Medizinische Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (2011)
- Heron SE, Smith KR, Bahlo M, Nobili L, Kahana E, Licchetta L, Oliver KL, Mazarib A, Afawi Z, Korczyn A, Plazzi G, Petrou S, Berkovic SF, Scheffer IE, Dibbens LM. Missense mutati-

8. Literaturverzeichnis

- ons in the sodium-gated potassium channel gene KCNT1 cause severe autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet* (2012) 44(11): 1188-90
- Hettema JM, Walsh D, Kendler KS. Testing the effect of season of birth on familial risk for schizophrenia and related disorders. *Br J Psychiatry* (1996) 168: 205-209
- Hirose S, Kurahashi H. ADNFLE, initial posting: May 16, 2002; last update: April 5, 2010. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al. (editors): *GeneReviews*TM [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-.
- Ho BC, Andreasen NC, Flaum M. Dependence on public financial support early in the course of schizophrenia. *Psychiatr Serv* (1997) 48: 948-950
- Hollis C. Child and adolescent (juvenile onset) schizophrenia: A case-control study of premorbid developmental impairments. *Br J Psychiatry* (1995) 166: 489-495
- Hosák L, Šilhan P, Hosáková J. Genome-wide association studies in schizophrenia, and potential etiological and functional implications of their results. *Acta Medica (Hradec Kralove)* (2012) 55: 3-11
- Hsu LYF, Benn PA, Tannenbaum HL, Perlis TE, Carlson AD. Chromosomal polymorphisms of 1, 9, 16 and Y in 4 major ethnic groups: a large prenatal study. *Am J Med Genet* (1987) 26: 95-101
- Hugues JR, Hatsukami DK, Mitchell JE, Dahlgren LA. Prevalence smoking among psychiatric outpatients. *Am J Psychiatry* (1986) 143: 993-7
- Ibelgaufts H. *Gentechnologie von A bis Z*. Wiley-VCH (1993)
- International Schizophrenia Consortium. Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. *Nature* (2008) 455: 237-241
- Ishida S, Picard F, Rudolf G, Noé E, Achaz G, Thomas P, Genton P, Mundwiller E, Wollf M, Marescaux C, Miles R, Baulac M, Hirsch E, Leguern E, Baulac S. Mutations of DEPDC5 cause autosomal dominant focal epilepsies. *Nat Genet* (2013) 45(5): 552-5
- Itier V, Bertrand D. Mutations of the neuronal nicotinic acetylcholine receptors and their association with ADNFLE. *Neurophysiol Clin* (2002) 32: 99-107
- Ito M, Kobayashi K, Fujii T, Okuno T, Hirose S, Iwata H, Mitsudome A, Kaneko S. Electroclinical picture of autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy in a Japanese family. *Epilepsia* (2000) 41: 52-8
- Ivanov D, Kirov G, Norton N, Williams HJ, Williams NM, Nikolov I, Tzvetkova R, Stambolova SM, Murphy KC, Toncheva D, Thapar A, O'Donovan MC, Owen MJ. Chromosome 22q11 deletions, velo-cardio-facial syndrome and early-onset psychosis : Molecular genetic study. *Br J Psychiatry* (2003) 183: 409-413
- Jeong SY, Goto J, Hashida H, Suzuki T, Ogata K, Masuda N, Hirai M, Isahara K, Uchiyama Y, Kanazawa I. Identification of a novel human voltage-gated sodium channel alpha subunit gene, SCN12A. *Biochem Biophys Res Commun* (2000) 267: 262-270
- Jolin EM, Weller RA, Weller EB. Psychosis in Children With Velocardiofacial Syndrome (22q11.2 Deletion Syndrome). *Curr Psychiatry Rep.* (2009) 11: 99-105
- Jones P, Rodgers B, Murray R, Marmot M. Child developmental risk factors for adult schizophrenia in the British 1946 birth cohort. *Lancet* (1994) 344: 1398-1402

8. Literaturverzeichnis

- Kähler AK, Djurovic S, Kulle B, Jönsson EG, Agartz I, Hall H, Opjordsmoen S, Jakobsen KD, Hansen T, Melle I, Werge T, Steen VM, Andreassen OA. Association Analysis of Schizophrenia on 18 Genes Involved in Neuronal Migration: MDGA1 as a New Susceptibility Gene. *M J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* (2008) 147B: 1089-1100
- Kanemoto K, Tsuji T, Kawasaki J. Reexamination of interictal psychoses based on DSM IV psychosis classification and international epilepsy classification. *Epilepsia* (2001) 42: 98-103
- Karayiorgou M, Morris MA, Morrow B, Shprintzen RJ, Goldberg R, Borrow J, Gos A, Nestadt G, Wolynec PS, Lasseter VK, Eisen H, Childs B, Kazazian HH, Kucherlapati R, Antonarakis SE, et al.. Schizophrenia susceptibility associated with interstitial deletions of chromosome 22q11. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995) 92: 7612-7616
- Karayiorgou M, Gogos JA. The molecular genetics of the 22q11-associated schizophrenia. *Brain Res Mol Brain Res* (2004) 132: 95-104
- Kawai J, Suzuki H, Hara A, Hirose K, Watanabe S. Human and mouse chromosomal mapping of Stac, a neuron-specific protein with an SH3 domain. *Genomics* (1998) 47: 140-142
- Kay SR, Fiszbein A, Opler LA. The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophr Bull* (1987) 13(2): 261-276
- Kendler KS, Gruenberg AM, Kinney DK. Independent diagnoses of adoptees and relatives as defined by DSM-III in the provincial and national samples of the Danish Adoption Study of Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* (1994) 51(6): 456-468
- Kennedy E, Kumar A, Datta S. Antipsychotic medication for childhood-onset schizophrenia. *Cochrane Database Syst Rev* (2007) 4: 1-44
- Kety SS, Wender PH, Jacobsen B, Ingraham LJ, Jansson L, Faber B, Kinney DK. Mental illness in the biological and adoptive relatives of schizophrenic adoptees. Replication of the Copenhagen Study in the rest of Denmark. *Arch Gen Psychiatry* (1994) 51(6): 442-455
- Khantzian EJ. The self-medication hypothesis of addictive disorders: focus on heroin and cocaine dependence. *Am J Psychiatry* (1985) 142: 1259-1264
- Kim Y, Zerwas S, Trace SE, Sullivan PF. Schizophrenia Genetics: Where Next? *Schizophr Bull* (2011) 37(3): 456-463
- Kirov G, O'Donovan MC, Owen MJ. Finding schizophrenia genes. *J Clin Invest* (2005) 115: 1440-1448
- Kirov G, Grozeva D, Norton N, Ivanov D, Mantripragada KK, Holmans P; International Schizophrenia Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium, Craddock N, Owen MJ, O'Donovan MC. Support for the involvement of large copy number variants in the pathogenesis of schizophrenia. *Hum Mol Genet* (2009) 18: 1497-1503
- Kishi T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, Okochi T, Inada T, Ozaki N, Iwata N. Genetic association analysis of tagging SNPs in alpha4 and beta2 subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptor genes (CHRNA4 and CHRN2) with schizophrenia in the Japanese population. *J Neural Transm* (2008) 115: 1457-1461
- Konrad A, Winterer G. Disturbed structural connectivity in schizophrenia primary factor in pathology or epiphenomenon? *Schizophr Bull* (2008) 34(1): 72-92

8. Literaturverzeichnis

- Kook SD, An SK, Kim KR, Kim WJ, Lee E, Namkoong K. Psychotic Features as the First Manifestation of 22q11.2 Deletion Syndrome. *Psychiatry Investig* (2010) 7: 72-74
- Kraepelin E. *Dementia praecox, Dementia praecox and paraphrenia*. E. & S. Livingstone, Edinburgh (1919): 181-184
- Kuang WJ, Sun RF, Zhu YS, Li SB. A new single nucleotide mutation (rs362719) of the reelin (RELN) gene associated with schizophrenia in female Chinese Han. *Genet Mol Res* (2011) 10: 1650-1658
- Kumra S, Schulz SC. Editorial: Research Progress in Early-Onset Schizophrenia. *Schizophr Bull* (2008) 34(1): 15-17
- Kunugi H, Lee KB, Nanko S. Cytogenetic findings in 250 schizophrenics: evidence confirming an excess of the X chromosome aneuploidies and pericentric inversion of chromosome 9. *Schizophr Res* (1990) 40: 43-47
- Kurian SM, Le-Niculescu H, Patel SD, Bertram D, Davis J, Dike C, Yehyaw N, Lysaker P, Dustin J, Caligiuri M, Lohr J, Lahiri DK, Nurnberger JI Jr, Faraone SV, Geyer MA. Identification of blood biomarkers for psychosis using convergent functional genomics. *Mol Psychiatry* (2011) 16: 37-58
- Ladehoff M. Assoziation zwischen Polymorphismen des GABA_B- und des Dopamin-D₂-Rezeptorgens und der Alkoholabhängigkeit. Medizinische Dissertation, Medizinische Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin (2007)
- Lau JK, Brown KC, Thornhill BA, Crabtree CM, Dom AM, Witte TR, Hardman WE, McNees CA, Stover CA, Carpenter AB, Luo H, Chen YC, Shiflett BS, Dasgupta P. Inhibition of cholinergic signaling causes apoptosis in human bronchioalveolar carcinoma. *Cancer Res* (2013) 73(4): 1328-39
- Lee KW, Woon PS, Teo YY, Sim K. Genome wide association studies (GWAS) and copy number variation (CNV) studies of the major psychoses: What have we learnt? *Neurosci Biobehav Rev* (2012) 36(1): 556-71
- Leniger T, Kananura C, Hufnagel A, Bertrand S, Bertrand D, Steinlein OK. A new Chrna4 mutation with low penetrance in nocturnal frontal lobe epilepsy. *Epilepsia* (2003) 44: 981-985
- Leonard S, Gault J, Adams C, Breese CR, Rollins Y, Adler LE, Olincy A, Freedman R. Nicotinic receptors, smoking and schizophrenia. *Restor Neurol Neurosci* (1998) 12: 195-201
- Leonard S, Adler LE, Benhammou K, Berger R, Breese CR, Drebing C, Gault J, Lee MJ, Logel J, Olincy A, Ross RG, Stevens K, Sullivan B, Vianzon R, Virmich DE, et al.. Smoking and mental illness. *Pharmacol Biochem Behav* (2001) 70: 561-70
- Leonard S, Freedman R. Genetics of Chromosome 15q13-14 in Schizophrenia. *Biol Psychiatry* (2006) 60: 115-122
- Lindsay J, Ounsted C, Richards P. Long-term outcome in children with temporal lobe seizures. III: Psychiatric aspects in childhood and adult life. *Dev Med Child Neurol* (1979) 21: 630-636
- Lourenço GJ, Silva PMR, Bognone RAV, De Souza RA, Delamain MT, Lima CS. Inherited pericentric inversion of chromosome 9 in acquired hematological disorders. *Ann Hematol* (2007) 86: 465-467

8. Literaturverzeichnis

- Madaan V, Dvir Y, Wilson DR. Child and adolescent schizophrenia: pharmacological approaches. *Expert Opin Pharmacother* (2008) 9: 2053-2068
- Magnusson A, Stordal E, Brodtkorb E, Steinlein O. Schizophrenia, psychotic illness and other psychiatric symptoms in families with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy caused by different mutations. *Psychiatr Genet* (2003) 13(2): 91-5
- Malaspina D, Harlap S, Fennig S, Heiman D, Nahon D, Feldman D, Susser ES. Advancing paternal age and the risk for schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* (2001) 58: 361
- Mann S, Liu D, Wang N, Williams-McGovern C, Fernandez AC, Lopez-Singh A, Dorrani N, Sigman M, Schanen C. Correlation of phenotypic features and idic(15) marker chromosomes in nine autistic probands. International Meeting for Autism Research, San Diego (2001)
- Maric NP, Svrakic DM. Why schizophrenia genetics needs epigenetics: a review. *Psychiatr Danub* (2012) 24(1): 2-18
- Markou A, Kosten TR, Koob GF. Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology* (1998) 18: 135-174
- Masi G, Liboni F. Management of schizophrenia in children and adolescents: focus on pharmacotherapy. *Drugs* (2011) 71: 179-208
- Matsuura M, Oana Y, Kato M, Kawana A, Kan R, Kubota H, Nakano T, Hara T, Horikawa N. A multicenter study on the prevalence of psychiatric disorders among new referrals for epilepsy in Japan. *Epilepsia* (2003) 44: 107-114
- Matsuura M, Adachi N, Oana Y, Okubo Y, Kato M, Nakano T, Takei N. A polydiagnostic and dimensional comparison of epileptic psychoses and schizophrenia spectrum disorders. *Schizophr Res* (2004) 69: 189-201
- Maynard TM, Haskell GT, Lieberman JA, LaMantia A-S. 22q11 DS: genomic mechanisms and gene function in DiGeorge/velocardiofacial syndrome. *Int J Dev Neurosci* (2002) 20: 407-419
- McDonald-McGinn DM, Kirschner R, Goldmuntz E, Sullivan K, Eicher P, Gerdes M, Moss E, Solot C, Wang P, Jacobs I, Handler S, Knightly C, Heher K, Wilson M, Ming JE, Grace K, Driscoll D, Pasquariello P, Randall P, Larossa D, et al.. The Philadelphia story: the 22q11.2 deletion: report on 250 patients. *Genet Couns* (1999) 10(1): 11-24
- McDonald-McGinn DM, Emanuel BS, Zackai EH. 22q11.2 Deletion Syndrome, initial posting: September 23, 1999; last update: February 28, 2013. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al. (editors): *GeneReviews*TM [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-.
- McGehee DS, Role LW. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu Rev Physiol* (1995) 57: 521-46
- McGuffin P, Owen MJ, Farmer AE. Genetic basis of schizophrenia. *Lancet* (1995) 346(8976): 678-682
- Mehler-Wex C, Warnke A. Klinik und Verlauf schizophrener Erkrankungen mit Beginn im Kindes- und Jugendalter, pp 41-50. In: Remschmidt H (editor): *Schizophrene Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter: Klinik, Ätiologie, Therapie und Rehabilitation*. Schattauer, Stuttgart (2004)

8. Literaturverzeichnis

- Mehler-Wex C, Renner TJ. Genetische Befunde zu Schizophrenie. *Z Kinder Jugendpsychiatr Psychother* (2008) 36(1): 17-26
- Mellers JD, Toone BK, Lishman WA. A neuropsychological comparison of schizophrenia and schizophrenia-like psychosis of epilepsy. *Psychol Med* (2000) 30: 325-335
- Mendez MF, Grau R, Doss RC, Taylor JL. Schizophrenia in epilepsy: seizure and psychosis variables. *Neurology* (1993) 43: 1073-1077
- Millar JK, Pickard BS, Mackie S, James R, Christie S, Buchanan SR, Malloy MP, Chubb JE, Huston E, Baillie GS, Thomson PA, Hill EV, Brandon NJ, Rain JC, Camargo LM, et al.. DISC1 and PDE4B Are Interacting Genetic Factors in Schizophrenia That Regulate cAMP Signaling. *Science* (2005) 310(5751): 1187-91
- Millar JK, Mackie S, Clapcote SJ, Murdoch H, Pickard BS, Christie S, Muir WJ, Blackwood DH, Roder JC, Houslay MD, Porteous DJ. Disrupted in schizophrenia 1 and phosphodiesterase 4B: towards an understanding of psychiatric illness. *J Physiol* (2007) 584(Pt 2): 401-405
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* (1998) 16(3): 1215
- Mitchell KJ, Porteous DJ. Rethinking the genetic architecture of schizophrenia. *Psychol Med* (2011) 41: 19-32
- Möller H-J, Laux G, Deister A. *Psychiatrie und Psychotherapie*. 4. Auflage Georg Thieme Verlag (Duale Reihe), Stuttgart (2009); Seiten 139-167
- Morais NL, Valcarel J. Splicing rainbow. <http://www.ebi.ac.uk/asd-srv/wb.cgi?method=8> (2010)
- Morrow B, Goldberg R, Carlson C, Das Gupta R, Sirotkin H, Collins J, Dunham I, O'Donnell H, Scambler P, Shprintzen R, Kucherlapati R. Molecular definition of the 22q11 deletions in velo-cardio-facial syndrome. *Am J Hum Genet* (1995) 56: 1391-1403
- Mudge J, Miller NA, Khrebtukova I, Lindquist IE, May GD, Huntley JJ, Luo S, Zhang L, van Velkinburgh JC, Farmer AD, Lewis S, Beavis WD, Schilkey FD, Virk SM, Black CF, et al.. Genomic convergence analysis of schizophrenia: mRNA sequencing reveals altered synaptic vesicular transport in post-mortem cerebellum. *PLoS ONE* (2008) 3(11): e3625
- Murphy KC. Schizophrenia and velo-cardio-facial syndrome. *Lancet* (2002) 359: 426-430
- Murphy KC, Jones LA, Owen MJ. High rates of schizophrenia in adults with velo-cardio-facial syndrome. *Arch Gen Psychiatry* (1999) 56: 940-945
- Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* (1998) 73: 127-141
- Nakken KO, Magnusson A, Steinlein OK. Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy: an electroclinical study of a Norwegian family with ten affected members. *Epilepsia* (1999) 40: 88-92
- Navarrete K, Pedroso I, De Jong S, Stefansson H, Steinberg S, Stefansson K, Ophoff RA, Schalkwyk LC, Collier DA. *TCF4* (*e2-2*; *ITF2*): A Schizophrenia-Associated Gene With Pleiotropic Effects on Human Disease. *Am J Med Genet Part B* (2013) 162B: 1-16
- Ng MY, Levinson DF, Faraone SV, Suarez BK, DeLisi LE, Arinami T, Riley B, Paunio T, Pulver AE, Irmansyah, Holmans PA, Escamilla M, Wildenauer DB, Williams NM, Laurent C, et

8. Literaturverzeichnis

- al.. Meta-analysis of 32 genome-wide linkage studies of schizophrenia. *Mol Psychiatry* (2009) 14(8): 774-85
- Nicolson R, Rapoport JL. Childhood-Onset Schizophrenia: Rare but Worth Studying. *Biol Psychiatry* (1999) 46: 1418-1428
- Niklasson L, Rasmussen P, Oskarsdóttir S, Gillberg C. Neuropsychiatric disorders in the 22q11 deletion syndrome. *Genet Med* (2001) 3(1): 79-84
- Niklasson L, Rasmussen P, Oskarsdóttir S, Gillberg C. Chromosome 22q11 deletion syndrome (CATCH 22): neuropsychiatric and neuropsychological aspects. *Dev Med Child Neurol* (2002) 44: 44-50
- Nuechterlein KH, Barch DM, Gold JM, Goldberg TE, Green MF, Heaton RK. Identification of separable cognitive factors in schizophrenia. *Schizophr Res* (2004) 72: 29-39
- Ochoa ELM, Lasalde-Dominicci J. Cognitive Deficits in Schizophrenia: Focus on Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors and Smoking. *Cell Mol Neurobiol* (2007) 27: 609-639
- Oldani A, Zucconi M, Ferini-Strambi L, Bizzozero D, Smirne S. Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy: electroclinical picture. *Epilepsia* (1996) 37: 964-76
- Oldani A, Zucconi M, Asselta R, Modugno M, Bonati MT, Dalpra L, Malcovati M, Tenchini ML, Smirne S, Ferini-Strambi L. Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. A video-polysomnographic and genetic appraisal of 40 patients and delineation of the epileptic syndrome. *Brain* (1998) 121(Pt 2): 205-32
- Olincy A, Young DA, Freedman R. Increased levels of the nicotine metabolite cotinine in schizophrenic smokers compared to other smokers. *Biol Psychiatry* (1997) 42: 1-5
- Olincy A, Stevens KE. Treating schizophrenia symptoms with an $\alpha 7$ nicotinic agonist, from mice to men. *Biochem Pharmacol* (2007) 74: 1192-1201
- Oskarsdóttir S, Belfrage M, Sandstedt E, Viggedal G, Uvebrant P. Disabilities and cognition in children and adolescents with 22q11 deletion syndrome. *Dev Med Child Neurol* (2005) 47: 177-184
- Oyebo F. The Neurology of Psychosis. *Med Princ Pract* (2008) 17: 263-269
- Oyebo F, Davison K. Epileptic schizophrenia: clinical features and outcome. *Acta Psychiatr Scand* (1989) 79: 327-331
- Papoulos DF, Faedda GL, Veit S, Goldberg R, Morrow B, Kucherlapati R, Shprintzen RJ. Bipolar spectrum disorders in patients diagnosed with velo-cardio-facial syndrome: Does a hemizygous deletion of chromosome 22q11 result in bipolar affective disorder? *Am J Psychiatry* (1996) 153: 1541-1547
- Perez MM, Trimble MR. Epileptic psychosis--diagnostic comparison with process schizophrenia. *Br J Psychiatry* (1980) 137: 245-249
- Perry E, Martin-Ruiz C, Lee M, Griffiths M, Johnson M, Piggott M, Haroutunian V, Buxbaum JD, Näsland J, Davis K, Gotti C, Clementi F, Tzartos S, Cohen O, Soreq H, et al.. Nicotinic receptor subtypes in human brain ageing. Alzheimer and Lewy body diseases. *Eur J Pharmacol* (2000) 393: 215-222
- Philip N, Bassett A. Cognitive, Behavioral and Psychiatric Phenotype in 22q11.2 Deletion Syndrome. *Behav Genet* (2011) 41(3): 403-412

8. Literaturverzeichnis

- Phillips HA, Favre I, Kirkpatrick M, Zuberi SM, Goudie D, Heron SE, Scheffer IE, Sutherland GR, Berkovic SF, Bertrand D, Mulley JC. CHRNA2 is the second acetylcholine receptor subunit associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Am J Hum Genet* (2001) 68(1): 225-31
- Picard F, Baulac S, Kahane P, Hirsch E, Sebastianelli R, Thomas P, Vigeveno F, Genton P, Guerrini R, Gericke CA, An I, Rudolf G, Herman A, Brice A, Marescaux C, et al.. Dominant partial epilepsies. A clinical, electrophysiological and genetic study of 19 European families. *Brain* (2000) 123(Pt 6): 1247-62
- Pickard BS, Millar JK, Porteous DJ, Muir WJ, Blackwood DH. Cytogenetics and gene discovery in psychiatric disorders. *Pharmacogenomics J* (2005) 5: 81-88
- Poliak S, Peles E. The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci* (2003) 4(12): 968-980
- Pool D, Bloom W, Mielke DH, Roniger JJ jun., Gallant GM. A controlled evaluation of loxitan in seventy-five adolescent schizophrenic patients. *Curr Ther Res Clin Exp* (1976) 19: 99-104
- Prasad SE, Howley S, Murphy KC. Candidate genes and the behavioral phenotype in 22q11.2 deletion syndrome. *Dev Disabil Res Rev* (2008) 14: 26-34
- Propping P, Nöthen MM, Körner J, Rietschel M, Maier W. Assoziationsuntersuchungen bei psychiatrischen Erkrankungen. *Nervenarzt* (1994) 65: 725-740
- Provini F, Plazzi G, Tinuper P, Vandi S, Lugaresi E, Montagna P. Nocturnal frontal lobe epilepsy. A clinical and polygraphic overview of 100 consecutive cases. *Brain* (1999) 122(Pt 6): 1017-31
- Pulver AE, Nestadt G, Goldberg R, Shprintzen RJ, Lamacz M, Wolyniec PS, Morrow B, Karayiorgou M, Antonarakis SE, Housman D. Psychotic illness in patients diagnosed with velo-cardio-facial syndrome and their relatives. *J Nerv Ment Dis* (1994) 182: 476-478
- Qin P, Xu H, Laursen TM, Vestergaard M, Mortensen PB. Risk for schizophrenia and schizophrenia-like psychosis among patients with epilepsy: population based cohort study. *BMJ* (2005) 331: 23
- Quednow BB, Brinkmeyer J, Mobascher A, Nothnagel M, Musso F, Gründer G, Savary N, Petrovsky N, Frommann I, Lennertz L, Spreckelmeyer KN, Wienker TF, Dahmen N, Thuerauf N, Clepce M, et al.. Schizophrenia risk polymorphisms in the TCF4 gene interact with smoking in the modulation of auditory sensory gating. *Proc Natl Acad Sci USA* (2012) 109: 6271-6276
- Raggenbass M, Bertrand D. Nicotinic Receptors in Circuit Excitability and Epilepsy. *J Neurobiol* (2002) 53: 580-589
- Ramegowda S, Savitha MR, Krishnamurthy B, Doddaiiah N, Prasanth SN, Ramachandra NB. Association between pericentric inversion in chromosome 9 and congenital heart defects. *Int J Hum Genet* (2007) 7: 241-248
- Realmuto GM, Erickson WD, Yellin AM, Hopwood JH, Greenberg LM. Clinical comparison of thiothixene and thioridazine in schizophrenic adolescents. *Am J Psychiatry* (1984) 141: 440-442
- Regier D, Narrow W, Rae D, Manderscheid R, Locke B, Goodwin F. The de facto US mental and addictive disorders service system. *Arch Gen Psychiatry* (1993) 50: 85-94

8. Literaturverzeichnis

- Reiss D, Plomin R, Hetherington EM. Genetics and psychiatry: an unheralded window on the environment. *Am J Psychiatry* (1991) 148(3): 283-291
- Rempel N, Heyers S, Engels H, Slegers E, Steinlein OK. The structures of the human neuronal nicotinic acetylcholine receptor $\beta 2$ - and $\alpha 3$ -subunit genes (CHRNA2 and CHRNA3). *Hum Genet* (1998) 103: 645-653
- Remschmidt H, Theisen F. Early-Onset Schizophrenia. *Neuropsychobiology* (2012) 66: 63-69
- Ripke S, Sanders AR, Kendler KS, Levinson DF, Sklar P, Holmans PA, Lin DY, Duan J, Ophoff RA, Andreassen OA, Scolnick E, Cichon S, St Clair D, Corvin A, Gurling H, et al.. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat Genet* (2011) 43: 969-976
- Ripoli N, Bronnec M, Bourin M. Nicotinic receptors and schizophrenia. *Curr Med Res Opin* (2004) 20(7): 1057-1074
- Robin NH, Shprintzen RJ. Defining the clinical spectrum of deletion 22q11.2. *Disabil Rehabil* (2005) 147: 90-96
- Rodriguez-Murillo L, Gogos JA, Karayiorgou. The Genetic Architecture of Schizophrenia: New Mutations and Emerging Paradigms. *Annu Rev Med* (2012) 63: 63-80
- Röpcke B, Eggers C. Early-onset schizophrenia: A 15-year follow-up. *Eur Child Adolesc Psychiatry* (2005) 14: 341-350
- Roelfsema JH, Peters DJM. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), 79-86. In: Walker JM, Rapley R (Eds.): *Molecular Biomethods Handbook*. Humana Press, Totowa, New Jersey (2005)
- Roser P, Kawohl W. Turner syndrome and schizophrenia: A further hint for the role of the X-chromosome in the pathogenesis of schizophrenic disorders. *World J Biol Psychiatry* (2010) 11(2): 239-242
- Russell AT. The clinical presentation of childhood-onset schizophrenia. *Schizophr Bull* (1994) 20: 631-646
- Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, Schuffenhauer S, Oechsler H, Belohradsky B, Prieur M, Aurias A, Raymond FL, Clayton-Smith J, Hatchwell E, McKeown C, Beemer FA, Dallapiccola B, Novelli G, Hurst JA, Ignatius J, et al.. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet* (1997) 34: 798-804
- Ryvlin P, Rheims S, Risse G. Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy. *Epilepsia* (2006) 47(Suppl12): 83-86
- Sachdev P. Schizophrenia-Like Psychosis and Epilepsy: The Status of the Association. *Am J Psychiatry* (1998) 155: 325-336
- Saporta MA, Grskovic M, Dimos JT. Induced pluripotent stem cells in the study of neurological diseases. *Stem Cell Res Ther* (2011) 2(5): 37
- Sargent PB. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci* (1993) 16(7): 403-43
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* (2002) 30(12): e57

8. Literaturverzeichnis

- Schröck E, Frensel A, Gerlach E, Stadler A, Hackmann K, Tinschert S, Werner W. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in der humangenetischen Diagnostik. *medgen* (2008) 20(4): 361-366
- Schulze TG, Detera-Wadleigh SD, Akula N, Gupta A, Kassem L, Steele J, Pearl J, Strohmaier J, Breuer R, Schwarz M, Propping P, Nöthen MM, Cichon S, Schumacher J, NIMH Genetics Initiative Bipolar Disorder Consortium, et al.. Two variants in Ankyrin 3 (*ANK3*) are independent genetic risk factors for bipolar disorder. *Mol Psychiatry* (2009) 14(5): 487-491
- Serra A, Brahe C, Millington-Ward A, Neri G, Tedeschi B, Tassane F, Bova R. Pericentric inversion of chromosome 9: prevalence in 300 Down syndrome families and molecular studies of nondisjunction. *Am J Med Genet* (1990) 7: 162-168
- Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, O'Hare AM, Hu P, Roe BA, Driscoll DA, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Budarf ML, Emanuel BS. Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum Mol Genet* (2000) 9: 489-501
- Shaikh TH, Kurahashi H, Emanuel BS. Evolutionarily conserved low copy repeats (LCRs) in 22q11 mediate deletions, duplications, translocations, and genomic instability: an update and literature review. *Genet Med* (2001) 3: 6-13
- Shashi V, Keshavan MS, Howard TD, Berry MN, Basehore MJ, Lewandowski E, Kwapil TR. Cognitive correlates of a functional COMT polymorphism in children with 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Genet* (2006) 69: 234-238
- Shayevitz C, Cohen OS, Faraone SV, Glatt SJ. A Re-Review of the Association Between the *NOTCH4* Locus and Schizophrenia. *Am J Med Genet Part B* (2012) 159B: 477-483
- Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome, p 615-632. In: Cassidy SB, Allanson J (editors): *Management of genetic syndromes*. 2nd Ed. Wiley-Liss, New York (2005a)
- Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome. *Prog Pediatr Cardiol* (2005b) 20: 187-193
- Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome: 30 Years of study. *Dev Disabil Res Rev* (2008) 14: 3-10
- Shprintzen RJ, Goldberg RB, Lewin ML, Sidoti EJ, Berkman MD, Argamaso RV, Young D. A new syndrome involving cleft palate, cardiac anomalies, typical facies, and learning disabilities: velo-cardio-facial syndrome. *Cleft Palate J* (1978) 15: 56-62
- Shprintzen RJ, Goldberg RB, Golding-Kushner KJ, Marion RW. Late-onset psychosis in the velo-cardio-facial syndrome. *Am J Med Genet* (1992) 42: 141-142
- Sieberger M, Runte I, Wilkening A, Pabst B, Ziegenbein M, Haltenhof H. Das neuropsychiatrische Spektrum des Velokardiofazialen Syndroms (Deletion 22q11.2). *Fortschr Neurol Psychiat* (2006) 74: 263-274
- Sitskoorn MM, Aleman A, Ebisch SJ, Appels MC, Kahn RS. Cognitive deficits in relatives of patients with schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Res* (2004) 71: 285-295
- Slater E, Beard AW, Glithero E. The schizophrenialike psychoses of epilepsy. *Br J Psychiatry* (1963) 109: 95-150
- Spencer EK, Kafantaris V, Padron-Gayol MV, Rosenberg CR, Campbell M. Haloperidol in schizophrenic children: early findings from a study in progress. *Psychopharmacol Bull* (1992) 28: 183-186

8. Literaturverzeichnis

- Spencer EK, Campbell M. Children with schizophrenia: Diagnosis, phenomenology, and pharmacotherapy. *Schizophr Bull* (1994) 20: 713-725
- Sporn A, Addington A, Reiss AL, Dean M, Gogtay N, Potocnik U, Greenstein D, Hallmayer J, Gochman P, Lenane M, Baker N, Tossell J, Rapoport JL. 22q11 deletion syndrome in childhood onset schizophrenia: an update. *Mol Psychiatry* (2004) 9: 225-226
- St. George-Hyslop PH, Levesque G, Levesque L, Rommens J, Westaway D, Fraser PE. Two homologous genes causing early-onset familial Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* (1996) 61: 559-564
- Stefansson H, Ophoff RA, Steinberg S, Andreassen OA, Cichon S, Rujescu D, Werge T, Pietilainen OP, Mors O, Mortensen PB, Sigurdsson E, Gustafsson O, Nyegaard M, Tuulio-Henriksson A, Ingason A, et al.. Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature* (2009) 460: 744-747
- Steinberg S, de Jong S, Andreassen OA, Werge T, Borglum AD, Mors O, Mortensen PB, Gustafsson O, Costas J, Pietilainen OP, Demontis D, Papiol S, Huttenlocher J, Mattheisen M, Breuer R, et al.. Common variants at VRK2 and TCF4 conferring risk of schizophrenia. *Hum Mol Genet* (2011) 20: 4076-4081
- Steinlein O. Die Genetik der idiopathischen Epilepsien. *Dt Ärztebl* (1999) 96: A-1346-1350 [Heft 20]
- Steinlein OK. Genetic disorders caused by mutated acetylcholine receptors. *Life Sci* (2007) 80: 2186-2190
- Steinlein OK, Mulley JC, Propping P, Wallace RH, Phillips HA, Sutherland GR, Scheffer IE, Berkovic SF. A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet* (1995) 11(2): 201-3
- Steinlein OK, Magnusson A, Stoodt J, Bertrand S, Weiland S, Berkovic SF, Nakken KO, Propping P, Bertrand D. An insertion mutation of the CHRNA4 gene in a family with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Hum Mol Genet* (1997) 6(6): 943-7
- Steinlein OK, Bertrand D. Nicotinic receptor channelopathies and epilepsy. *Pflugers Arch – Eur J Physiol* (2010) 460: 495-503
- Steinlein OK, Hoda JC, Bertrand S, Bertrand D. Mutations in familial nocturnal frontal lobe epilepsy might be associated with distinct neurological phenotypes. *Seizure* (2012) 21(2): 118-23
- Stephens SH, Logel J, Barton A, Franks A, Schultz J, Short M, Dickenson J, James B, Fingerlin TE, Wagner B, Hodgkinson C, Graw S, Ross RG, Freedman R, Leonard S. Association of the 5'-upstream regulatory region of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor subunit gene (*CHRNA7*) with schizophrenia. *Schizophr Res* (2009) 109(1-3): 102-112.
- Sullivan KE, Jawad AF, Randall P, Driscoll DA, Emanuel BS, McDonald-McGinn DM, Zackai EH. The frequency and severity of immunodeficiency in chromosome 22q11.2 deletion syndromes (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Clin Diagn Lab Immunol* (1998) 5: 415-417
- Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry* (2003) 60: 1187-1192

8. Literaturverzeichnis

- Sunnucks P, Wilson ACC, Beheregaray LB, Zenger K, French J, Taylor AC. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol Ecol* (2000) 9: 1699-1710
- Sutor B, Zolles G. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors and autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy: a critical review. *Pflugers Arch – Eur J Physiol* (2001) 442: 642-651
- Swillen A, Devriendt K, Legius E, Eyskens B, Dumoulin M, Gewillig M, Fryns JP. Intelligence and psychosocial adjustment in velocardiofacial syndrome: a study of 37 children and adolescents with VCFS. *J Med Genet* (1997) 34: 453-458
- Swillen A, Devriendt K, Vantrappen G, Vogels A, Rommel N, Eyskens B, Dumoulin M, Gewillig M, Fryns JP. Familial deletions in 22q11: the Leuven experience. *Am J Med Genet* (1998) 80: 531-532
- Tam GWC, Redon R, Carter NP, Grant SGN. The Role of DNA Copy Number Variation in Schizophrenia. *Biol Psychiatry* (2009) 66: 1005-1012
- Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA. Schizophrenia, “just the facts”: what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. *Schizophr Res* (2008) 102: 1-18
- Taylor DC. Factors influencing the occurrence of schizophrenia-like psychosis in patients with temporal lobe epilepsy. *Psychol Med* (1975) 5: 249-254
- Thomas P, Picard F, Hirsch E, Chatel M, Marescaux C. Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Rev Neurol (Paris)* (1998) 154: 228-35
- Tiihonen J, Lonnqvist J, Wahlbeck K, Klaukka T, Niskanen L, Tanskanen A, Haukka J. 11-year follow-up of mortality in patients with schizophrenia: a population-based cohort study (FIN11 study). *Lancet* (2009) 374: 620-627
- Tiwari AK, Zai CC, Müller DJ, Kennedy JL. Genetics in schizophrenia: where are we and what next? *Dialogues Clin Neurosci* (2010) 12(3): 289-303
- Torrey EF, Buka S, Cannon TD, Goldstein JM, Seidman LJ, Liu T, Hadley T, Rosso IM, Bearden C, Yolken RH. Paternal age as a risk factor for schizophrenia: how important is it? *Schizophr Res* (2009) 114: 1
- Trimble MR, Ring HA, Schmitz B. Epilepsy, 469-89. In: Fogel BS, Schiffer RB, Rao SM (eds.): *Synopsis of neuropsychiatry*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (2000)
- Tsuang MT, Stone WS, Faraone SV. Genes, environment and schizophrenia. *Br J Psychiatry Suppl* (2001) 40: s18-24
- Tural S, Günes S, Kara N, et al.. A case of habitual abortus karyotyped 46, XX, Inv (9) (p11q13) X2 with Inv (9) (p11q13) in both of homolog chromosome pairs. *Turkiye Klinikleri J Gynecol Obst* (2007) 17: 331-333
- Usiskin SI, Nicolson R, Krasnewich DM, Yan W, Lenane M, Wudarsky M, Hamburger SD, Rapoport JL. Velocardiofacial Syndrome in Childhood-Onset Schizophrenia. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* (1999) 38(12): 1536-1543
- van Os J, Kapur S. Schizophrenia. *Lancet* (2009) 374: 635-645
- VCFS Educational Foundation. <http://www.vcfsef.org/>
- Vereczkei A, Mirnics K. Genetic predisposition to schizophrenia: what did we learn and what does the future hold? *Neuropsychopharmacol Hung* (2011) 13(4): 205-10

8. Literaturverzeichnis

- Vyas NS, Gogtay N. Treatment of early onset schizophrenia: recent trends, challenges and future considerations. *Front Psychiatry* (2012) 3: 29
- Wallace AJ. SSCP/Heteroduplex Analysis, 151-163. In: Theophilus BDM, Rapley R (Eds.): *Methods in Molecular Biology, Volume 187: PCR Mutation Detection Protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey (2002)
- Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE, Addington AM, Pierce SB, Cooper GM, Nord AS, Kusenda M, Malhotra D, Bhandari A, Stray SM, Rippey CF, Roccanova P, Makarov V, Lakshmi B, et al.. Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science* (2008) 320: 539-543
- Watanabe Y, Someya T, Nawa H. Cytokine hypothesis of schizophrenia pathogenesis: evidence from human studies and animal models. *Psychiatry Clin Neurosci* (2010) 64(3): 217-30
- Wedenoja J, Loukola A, Tuulio-Henriksson A, Paunio T, Ekelund J, Silander K, Varilo T, Heikkilä K, Suvisaari J, Partonen T, Lönnqvist J, Peltonen L. Replication of linkage on chromosome 7q22 and association of the regional reelin gene with working memory in schizophrenia families. *Mol Psychiatry* (2008) 13: 673-684
- Wedenoja J, Tuulio-Henriksson A, Suvisaari J, Loukola A, Paunio T, Partonen T, Varilo T, Lönnqvist J, Peltonen L. Replication of association between working memory and reelin, a potential modifier gene in schizophrenia. *Biol Psychiatry* (2010) 67: 983-991
- Weinzimer SA, McDonald-McGinn DM, Driscoll DA, Emanuel BS, Zackai EH, Moshang T Jr.. Growth hormone deficiency in patients with 22q11.2 deletion: Expanding the phenotype. *Pediatrics* (1998) 101: 929-932
- Weiss KM. *Genetic Variation and Human Disease: Principles and Evolutionary Approaches*. Cambridge University Press, New York (1993)
- Werry JS, McClellan JM, Chard L. Childhood and adolescent schizophrenic, bipolar and schizoaffective disorders: a clinical and outcome study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* (1991) 30: 457-465
- Wiehahn GJ, Bosch GP, du Preez RR, Pretorius HW, Karayiorgou M, Roos JL. Assessment of the Frequency of the 22q11 Deletion in Afrikaner Schizophrenic Patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* (2004) 129B: 20-22
- Williams NM. Molecular Mechanisms in 22q11 Deletion Syndrome. *Schizophr Bull* (2011) 37(5): 882-889
- Wittchen HU, Zaudig M, Fydrich T. *Strukturiertes Klinisches Interview für DSM- IV (SKID- I und SKID- II)*. Hogrefe Verlag, Göttingen (1997)
- Woodin M, Wang PP, Aleman D, McDonald-McGinn D, Zackai E, Moss E. Neuropsychological profile of children and adolescents with the 22q11.2 microdeletion. *Genet Med* (2001) 3: 34-39
- Xu B, Roos JL, Levy S, van Rensburg EJ, Gogos JA, Karayiorgou M. Strong association of de novo copy number mutations with sporadic schizophrenia. *Nat Genet* (2008) 40: 880-885
- Yamamoto Y, Mizuno R, Nishimura T, Ogawa Y, Yoshikawa H, Fujimura H, Adachi E, Kishimoto T, Yanagihara T, Sakoda S. Cloning and expression of myelin-associated oligodendrocytic basic protein. A novel basic protein constituting the central nervous system myelin. *J Biol Chem* (1994) 269: 31725-31730

8. Literaturverzeichnis

- Yan W, Jacobsen LK, Krasnewich DM, Guan X, Lenane MC, Paul SP, Dalwadi HN, Zhang H, Long RT, Kumra S, Martin BM, Scambler PJ, Trent JM, Sidransky E, Ginns EI, Rapoport JL. Chromosome 22q11.2 Interstitial Deletions Among Childhood-Onset Schizophrenics and „Multidimensionally Impaired“. Am J Med Genet (1998) 81: 41-43
- Yolken RH, Karlsson H, Yee F, Johnston-Wilson NL, Torrey EF. Endogenous retroviruses and schizophrenia. Brain Res Brain Res Rev (2000) 31: 193-199
- Yuan A, Yi Z, Wang Q, Sun J, Li Z, Du Y, Zhang C, Yu T, Fan J, Li H, Yu S. *ANK3* as a Risk Gene for Schizophrenia: New Data in Han Chinese and Meta Analysis. Am J Med Genet Part B (2012) 159B: 997-1005
- Zipp HP. Die Bedeutung von Neuregulin 1 in der Schizophrenie. Medizinische Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (2005)

Internetquellen:

www.parkinson-web.de

<http://www.nami.org/>

<http://www.szgene.org>

<http://www.doccheck.de>

<http://www.psychology48.com>

<http://flexikon.doccheck.com/de/Gelelektrophorese>

<http://flexikon.doccheck.com/de/Restriktionsenzym>

http://chemgapedia.de/vsengine/popup/vsc/de/glossar/s/si/silberf_00228rbung.glos.html

<http://www.abbottmolecular.com/us/chromosome/22.html>

<http://www.mangen.co.uk/media/21963/chromosome%inversions.pdf>

<http://www.szgene.org/chromo.asp?c=1>

<http://www.szgene.org/geneoverview.asp?geneid=492>

<https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/heteroduplex-analysis>

<http://www.bioscientia.de>

8. Literaturverzeichnis

Internettools:

<http://www.restrictionmapper.org>

http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi

9. Danksagung

9. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Steinlein für die Überlassung des Themas bedanken und dafür dass ich mit Fragen und Problemen stets ein offenes, freundliches und gut gelauntes Ohr bei ihr fand.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Rainer Wimmer, dem damaligen Leiter des zytogenetischen Labors und Frau Dr. Christa Schmidt, die mich in allen molekulargenetischen Belangen unterstützte. Herr Dr. Stefan Müller half mir bei der Beantwortung meiner zytogenetischen Fragen während der Fertigstellung dieser Arbeit.

Gedankt sei auch allen Mitarbeitern/innen des Humangenetikinstituts – für die Einarbeitung in zyto- und molekulargenetische Methoden, die freundlichen Gespräche, die angenehme Atmosphäre und Hilfe. Herr Franz Jansen hat mich bei der DNA-Extraktion der Proben sehr unterstützt.

Aus der Psychiatrischen Klinik danke ich Frau Dr. Annette Hartmann, Frau Dr. Heike Konnerth, Herrn Prof. Dr. Dan Rujescu und v.a. Frau Beate Kauschat, die sich ausdauernd um die Aufzucht der Lymphozytenkulturen kümmerte.

Ich danke meinen Eltern für ihre stets aufbauenden und antreibenden Worte und meiner Schwester für die austauschenden Gespräche und die gegenseitige Unterstützung in allen Lebenslagen.

Meinem Mann bin ich für seine große Geduld und Unterstützung dankbar; er musste mich für diese Dissertation an einigen Wochenenden und Abenden entbehren.

Mariele, dir danke ich für die Kinderbetreuung, - und vor allem für deine Freundschaft! Du bleibst immer bei uns und in unseren Herzen!

Zu guter Letzt danke ich meiner kleinen Tochter Luisa dafür, dass sie in mein Leben getreten ist und dafür, dass sie es immer wieder schafft, viele vermeintlich wichtige Dinge plötzlich unwichtig werden zu lassen.

10. Erklärung

10. Erklärung

Hiermit erkläre ich, Christine Monika Vogt, geboren am 30.03.1982 in München, dass ich die Dissertation selbständig angefertigt habe und mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient habe, und dass ich alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Die hier vorgelegte Dissertation wurde nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht.

Christine Vogt